

THESIS

MUNICH

1967

VERSUCHE ÜBER DIE STEIGERUNG  
DER NEBENNIEREN-PROTEIN-SYNTHESE DURCH ACTH

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
MEDICAL CENTER  
STANFORD, CALIF. 94305

MARIANNE FRIES



Digitized by the Internet Archive  
in 2026





AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Direktor: Professor Dr. Dr. Gustav BODECHTEL

---

VERSUCHE ÜBER DIE STEIGERUNG DER NEBENNIEREN-PROTEIN-  
SYNTHESE DURCH ACTH<sup>+</sup>)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Marianne F r i e s  
aus Nürnberg

München 1967

+ ) Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

---

LEIDIG-Druck, 8 München-2, Dachauerstr. 46/I, Tel. 59 21 24

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|                      |                                |
|----------------------|--------------------------------|
| Berichterstatter;    | Priv. Doz. Dr. P. C. SCRIBA    |
| Mitberichterstatter; | Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL |
| Dekan;               | Professor Dr. F. HOLLE         |

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 12. 1967

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                   | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| EINLEITUNG                                                                        | 5     |
| METHODEN UND ERGEBNISSE                                                           | 10    |
| I. SACCHAROSE-DICHTE-GRADIENTEN-ZENTRIFUGATION                                    | 10    |
| II. PROTEINSYNTHESE IM NEBENNIERENHOMOGENAT                                       | 17    |
| 1. Homogenisation                                                                 | 17    |
| 2. Fraktionierung durch Zentrifugation                                            | 18    |
| 3. Chromatographische Auftrennung der löslichen Zellfraktion                      | 18    |
| 4. Testsystem zur Messung des Einbaus von $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren in Protein | 22    |
| III. POLYSOMEN-RIBOSOMEN                                                          | 25    |
| 1. Präparation von Polysomen und Ribosomen                                        | 25    |
| 2. Proteinbestimmung nach LOWRY                                                   | 28    |
| 3. Ribonucleinsäurebestimmung nach SCHNEIDER und DISCHE                           | 28    |
| 4. Dichte-Gradienten-Zentrifugation von Polysomen und Ribosomen                   | 29    |
| IV. INKUBATION VON POLYSOMEN UND AMINO-ACYLTRANSFERASE                            | 30    |
| V. BEZIEHUNGEN ZWISCHEN CORTICOIDSYNTHESE UND PROTEINSYNTHESE IN DER NEBENNIERE   | 32    |
| DISKUSSION                                                                        | 35    |
| ZUSAMMENFASSUNG                                                                   | 37    |
| LITERATURVERZEICHNIS                                                              | 39    |



## EINLEITUNG

Das Adrenocorticotropin (ACTH) wird im Hypophysenvorderlappen (HVL) synthetisiert und gelangt aus dem HVL über die venösen Abflußbahnen in die Vena jugularis. Daher ist die Konzentration von ACTH höher als in anderen venösen Gebieten (1, 2). Nur ein sehr geringer Teil des ACTH (2) gelangt über das Blut, das für das Hormon als Transportorgan fungiert und Verteilung, Abbau und Ausscheidung vermittelt, in die Nebenniere, wo unter seiner Einwirkung Corticosteroide vermehrt ausgeschüttet und synthetisiert werden. Es sind außerdem noch andere Wirkungen des ACTH auf die Nebennierenrinde bekannt (3 - 7). ACTH führt prompt zur Ausschüttung von Ascorbinsäure (8), es ist ferner für Größe und Gewicht der Nebenniere verantwortlich (9, 9a, 9b) und steigert die Durchblutung der Nebenniere (10 - 14).

Unser Interesse galt vor allem der Frage, inwieweit und auf welchem Weg ACTH den Aminosäure-Einbau in die Nebenniere stimuliert. Aus in vitro Experimenten von BRANSOME und REDDY (15) wissen wir, daß ACTH den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Glykokoll bzw. -Lysin in das Eiweiß von viergeteilten Rattennebenennieren beschleunigt. Ein solcher in vitro Effekt des ACTH auf die Proteinsynthese wurde jedoch von anderen Autoren nicht gefunden (16, 17, 18). In vivo Behandlung von Ratten mit ACTH läßt dagegen den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Glycin in Protein durch 15 000 x g Überstand von Nebennierenhomogenaten (= zellfreies Homogenat) ansteigen (19). Der biochemische Mechanismus dieser ACTH-Wirkung, d.h. die Frage, welche Faktoren geschwindigkeitsbestimmend sind, ist noch keineswegs aufgeklärt. Es ging uns daher darum, den oder die Faktoren näher zu bestimmen, die diese Steigerung bewirken.

Wir halten es für zweckmäßig, eine kurz gefaßte Darstellung der heute geltenden Anschauung (20, 21, 22) über die Biochemie der Proteinsynthese den Ergebnissen voranzustellen (Abb. 1).

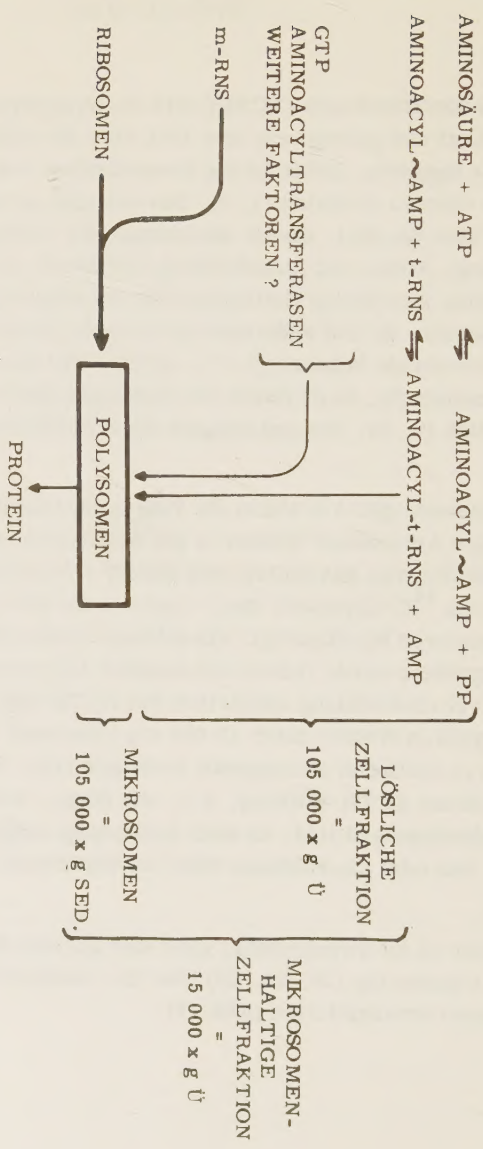


Abb. 1

Schematische Darstellung der Biochemie der Proteinsynthese.

ATP = Adenosintriphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat  
 t-RNS = Transfer-Ribonucleinsäure, m-RNS = Messenger-Ribonucleinsäure,  
 PP = Pyrophosphat

Aus Arbeiten von HOAGLAND und ZAMECNIK (23, 24) ist bekannt, daß Aminosäuren zuerst mit Adenosintriphosphat aktiviert werden, und dann der Aminoacylrest auf eine Acceptor-Ribonucleinsäure der löslichen Zellfraktion (d. i. der 105 000 x g Überstand eines Homogenates) übertragen wird. Diese beiden Schritte werden von den "pH 5 Enzymen" oder auch von den Aminoacyl-t-RNS-Synthetasen katalysiert. Die an die Acceptor-RNS gebundenen Aminosäuren werden danach auf die an Ribosomen bzw. Polyosomen in Synthese befindlichen Peptidketten übertragen. Die Acceptor-RNS wird daher auch Transfer-RNS genannt. Dieser Vorgang ist Guanosintriphosphat-abhängig (25), der Angriffspunkt der Transferenzyme (Aminoacyltransferasen) und der "Messenger-Ribonucleinsäure", die nach neueren Vorstellungen die Proteinsynthese qualitativ wie auch quantitativ regulieren soll (26, 27, 28, 29).

Für die weiteren Ausführungen ist es wichtig, auf die Transferenzyme, die für die Übertragung der Aminoacylgruppe auf die in Synthese befindliche Peptidkette mitverantwortlich sind, näher einzugehen. Man kennt zwei Aminoacyltransferasen, von denen eine stabil, die andere relativ instabil ist (30-38). Für die Proteinsynthese in mikrosomenhaltigen Systemen scheint die Aminoacyltransferase I allein auszureichen vermutlich, weil die Transferfaktoren teilweise an Mikrosomen oder Ribosomen gebunden sind (32).

Um den Mechanismus der Stimulierung der in vitro Proteinsynthese durch in vivo ACTH-Behandlung zu untersuchen, galt es vor allem, die geschwindigkeitsbestimmenden Faktoren genauer zu spezifizieren. Es mußte zunächst die Natur des Faktors in der löslichen Zellfraktion der Rattennebenniere (105 000 x g Überstand) geklärt werden, der für die in vitro Proteinsynthese geschwindigkeitsbestimmend ist (18, 19, 39, 40).

Im Vordergrund stand zunächst die Frage, ob der gesuchte Faktor ein Enzymprotein, z. B. eine Aminoacyltransferase oder eine Messenger-RNS, also ein Nucleoprotein ist (18, 40). Dieser Faktor der löslichen Zellfraktion (= 105 000 x g Überstand) ist nicht dialysierbar (19), er wird bei 55°C und ebenso durch Trypsin inaktiviert, ist stabil gegen Ribonuclease und hat ein Molekulargewicht von etwa 100 000 - 140 000, entsprechend einem S-Wert von 6 - 7 (39, 40). Daraus und aus chromatographischen Untersuchungen mit DEAE-Cellulose-Säulen konnte geschlossen werden, daß es sich bei dem Faktor um eine Aminoacyltransferase handelte. Die Anreicherung dieses Faktors aus der löslichen Zellfraktion von Schweinenebenennieren wird im Ergebnisteil eingehend beschrieben.

Zu untersuchen war weiterhin die Bedeutung der Mikrosomen bzw. der Ribosomen für die Proteinsynthese im Nebennierenhomogenat. FARESE (41, 42) hat gezeigt, daß die Aktivität der mikrosomalen Fraktion (15 000 x g Überstand) nach ACTH-Behandlung zunächst absinkt, später aber jedoch über die Werte von Kontrolltieren hinausgeht. In weiteren Untersuchungen hat FARESE die Rolle der Polysomen für die durch ACTH gesteigerte in vitro Proteinsynthese geprüft (43). Unser Interesse war jetzt, ob und unter welchen Bedingungen Präparationen von Polysomen, die als Polymere von Ribosomen und m-RNS aufzufassen sind, geschwindigkeitsbestimmend für die in vitro Proteinsynthese sind. Dadurch sollte gleichzeitig die Beteiligung von Messenger-RNS an der gesteigerten Proteinsynthese geklärt werden.

Wir haben daher in kinetischen Untersuchungen Inkubationen von verschiedenen Mengen von Polysomen mit steigenden Mengen löslicher Zellfraktion und mit dem oben erwähnten Proteinfaktor durchgeführt um zu klären, welche dieser Faktoren geschwindigkeitsbestimmend ist. Da bekannt ist, daß der geschwindigkeitsbestimmende Faktor der löslichen Zellfraktion nicht spezies-spezifisch ist (40), war uns die Möglichkeit gegeben, die mikrosomenhaltige Fraktion wie auch den Proteinfaktor aus den leichter und in größeren Mengen zugänglichen Schweinenebennieren zu präparieren.

Der Wirkungsmechanismus von Hormonen ist zur Zeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. In vielen Laboratorien interessiert die Frage, inwieweit Hormone auf die Proteinsynthese bzw. auf die Synthese der Nucleinsäure wirken. Zu erwähnen sind Arbeiten über die Wirkungen von Testosteron (43 - 47), Oestrogen (48 - 52), Corticosteroiden (53 - 58), der Schilddrüsenhormone (59 - 66), des Insulins (67 - 72), des Wachstumshormons (73 - 75), des thyreotropen Hormons (76) und des Adrenocorticotropen Hormons (6, 18, 19, 39, 44, 77-90).

Der Wirkungsmechanismus des ACTH ist noch keineswegs vollständig aufgeklärt, es wurden jedoch verschiedene Theorien darüber aufgestellt. Man diskutierte, daß ACTH die Permeabilität der Zellmembran ändert und durch Entfernung eines Hemmfaktors oder vermehrte Zufuhr eines erforderlichen Substrats zur Steigerung der Corticoidsynthese führt (3, 4, 18, 91-93). Vorstellbar wäre, daß ACTH in der Nebennierenrindenzelle vermehrt Substrate bereitstellt, die zur Corticoidsynthese notwendig sind (94, 95). Es ist noch zu überlegen, ob ACTH die Aktivität oder den Gehalt an Enzymen, die für die Steroidsynthese notwendig sind, beeinflußt (96, 97). Allgemein gesehen ist es von Bedeutung, in welcher zeitlichen Reihenfolge die verschiedenen durch ACTH ausgelösten Effekte auftreten und von welcher Dosis sie auslösbar sind. Man

sollte schließlich auch bedenken, daß ACTH eventuell nicht nur eine Primärwirkung hat, sondern die verschiedenen Wirkungen von ACTH auf voneinander unabhängigen Mechanismen beruhen könnten.

Neben der Frage, die ACTH die Proteinsynthese in der Nebenniere beschleunigt, untersuchten wir daher, inwieweit die Wirkungen von ACTH auf Proteinsynthese und Corticoidsynthese kausal verknüpft sind. FERGUSON und andere Autoren (98 - 101) schlossen aus Versuchen, bei denen nach Blockierung der Proteinsynthese durch Puromycin die Corticoidsynthese nach ACTH-Gabe nicht stimuliert wurde, daß die Proteinsynthese für die Beschleunigung der Corticoidsynthese notwendig sei. Wir haben das Verhalten der in vivo Corticoidsynthese und in vitro Proteinsynthese an Ratten nach Hypophysektomie und in vivo ACTH-Gaben beobachtet. Es ist bekannt, daß die Corticosteroninkretion 60 - 90 Minuten nach Hypophysektomie auf einen Basiswert absinkt (102 - 104) und nach einigen Stunden bereits durch ACTH Infusionen geringer zu erhöhen ist (1, 13, 105, 106). Es war nun zu prüfen, wie die in vitro Proteinsynthese nach Hypophysektomie durch ACTH-Gaben zu stimulieren ist. Weiterhin hat uns die Ansprechbarkeit der Protein- und Corticoidsynthese auf ACTH-Injektionen längere Zeit (in unserem Fall acht Tage) nach Hypophysektomie interessiert. Aus den Ergebnissen kann, wie unten näher ausgeführt, geschlossen werden, daß kein obligater Zusammenhang zwischen der Ansprechbarkeit der Corticosteroid- und der Proteinsynthese auf ACTH besteht (107).

## I. DICHT-GRADIENTEN-ZENTRIFUGATION

Die Dichte-Gradienten-Zentrifugation (108, 109) ist eine sehr elegante und relativ leicht durchzuführende Methode, Moleküle verschiedener Molekulargewichte zu trennen und unbekannte Molekulargewichte zu bestimmen. Man unterscheidet drei verschiedene Prinzipien der Dichte-Gradienten-Zentrifugation (111):

### 1. Stabilized Moving Boundary Centrifugation:

Das Ziel dieser Methode ist es, Sedimentationskoeffizienten zu bestimmen.

### 2. Zone Centrifugation:

Diese dient zur Trennung der Teilchen, die verschiedene Sedimentationskoeffizienten haben. Diese Art der Dichte-Gradienten-Zentrifugation wird vor allem dann verwendet, wenn z. B. ein Gemisch verschiedener Enzyme auf einen Gradienten gelagert wird und diese durch die verschieden schnelle Wanderungsgeschwindigkeit auf den Gradienten getrennt werden sollen. Aus der Wanderungsgeschwindigkeit ist auf den Sedimentationskoeffizienten und somit auf das Molekulargewicht der zu untersuchenden Substanzen zu schließen.

a) Der Sedimentationskoeffizient (für eine bestimmte Temperatur) ist die Sedimentationsgeschwindigkeit bezogen auf die Einheit der Zentrifugalbeschleunigung

$$S_T = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 x}$$

Dabei ist  $\omega$  = Winkelgeschwindigkeit der Zentrifuge,  $x$  = Abstand der Drehachse. Der Sedimentationskoeffizient hat die Dimension einer Zeit. Man bezeichnet die Zeit  $10^{-13}$  sec als eine Svedberg-Einheit (111 a).

b) Die Beziehung zwischen Sedimentationskoeffizient und Molekulargewicht ist nach MARTIN und AMES (110) durch folgende Gleichung gegeben:

$$\frac{S_1}{S_2} = \left( \frac{MG_1}{MG_2} \right)^{\frac{2}{3}}$$

S = Sedimentationskoeffizient

MG = Molekulargewicht

### 3. Isopycnic Gradient Centrifugation:

Bei diesem Verfahren basiert die Trennung allein auf der verschiedenen Dichte der einzelnen Moleküle.

#### Herstellungsprinzip von Dichte-Gradienten:

Ein Dichte-Gradient wird durch kontinuierliche Übereinanderschichtung verschieden dichter Lösungen in einem Zentrifugenröhrchen hergestellt.

#### Apparat zur Herstellung von Saccharose-Dichte-Gradienten:

Ein einfacher Glasapparat (Abb. 2), den wir modifiziert nach BRITTEN und ROBERTS (112) anfertigen ließen (18, 40), wird bei geschlossenen Hähnen I und II gefüllt. In den Schenkel A wurden 3,45 ml (Totvolumen A = 0,95 ml + Nutzvolumen A = 2,5 ml) 13 % Saccharose 0,005 M  $MgCl_2$  0,025 M KCl in 0,05 M Tris HCl Puffer pH 7,5 gefüllt. In den Schenkel B kamen 0,35 ml (Totvolumen) und 2,5 ml (Nutzvolumen) der gleichen Lösung ohne Saccharose. In beiden Schenkeln sollen, nach vorsichtigem Entfernen der Luftblasen aus den Schenkeln und aus dem Durchlaß des Hahns II die Flüssigkeitsspiegel gleich hoch sein. Dann wurde langsam eine Glaskapillare in den Schenkel A eingeführt und durch sie die Flüssigkeit A mit Preßluft durchmischt. Die Kapillare soll bis unterhalb des Hahns I eingeführt werden, um zu erreichen, daß die Mischwirkung der Preßluft auch unterhalb des Hahns I noch wirksam wird. Es wurde nun der Hahn I ganz geöffnet und möglichst gleichzeitig der Hahn II so weit aufgemacht, daß ein langsames kontinuierliches Herausfließen gewährleistet ist. Die Zentrifugenröhrchen (Cellulose Tubes, Beckman Instruments Nr. 305 050) werden bis zu einer Füllhöhe von 4,5 cm in ca. 5 - 7 min. gefüllt (Abb. 2).

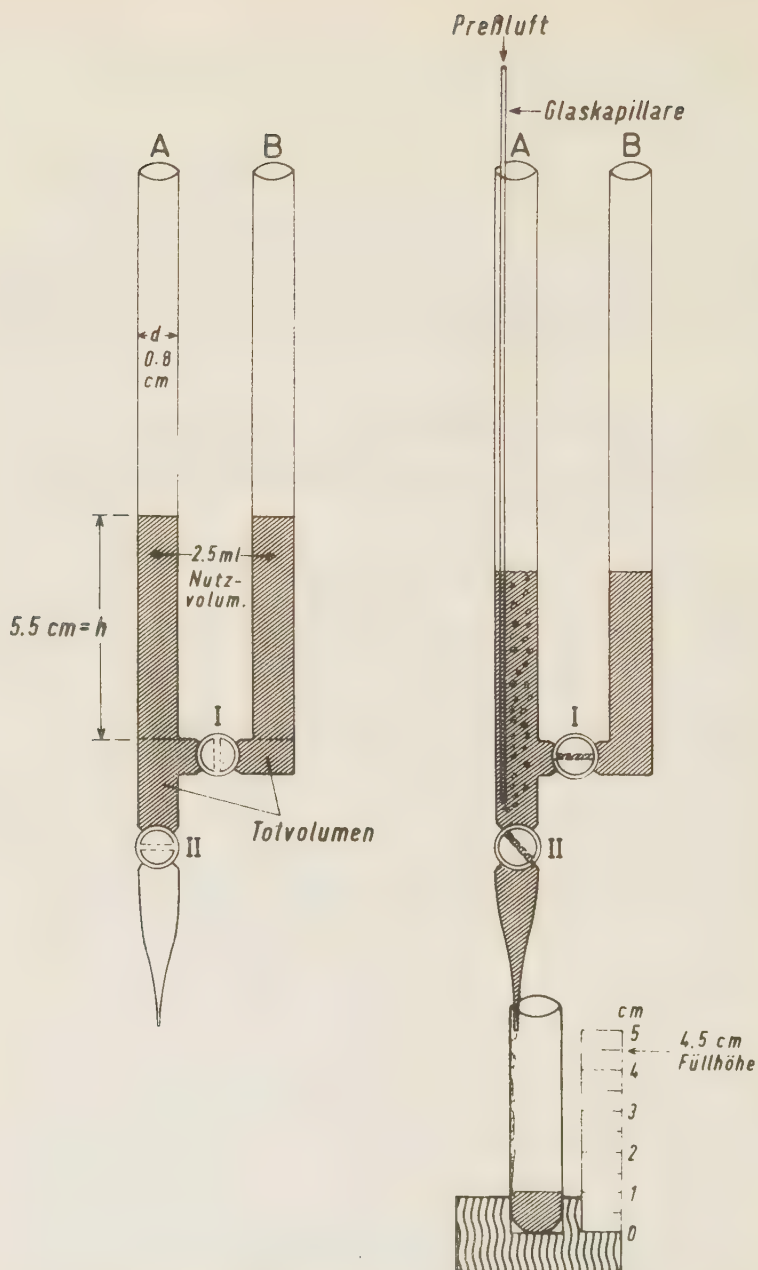


Abb. 2 Glasapparat zur Herstellung von Saccharose-Dichte-Gradienten  
Beschreibung siehe Text.

Je drei Gradienten dieser Art wurden im Swinging Bucket Rotor SW 39 der Spinco Model L Centrifuge (Beckman Instruments) 2 Stunden bei 37 500 UPM bei 2 - 4 ° C zentrifugiert und damit stabilisiert.

#### Punktion der Zentrifugenröhrchen:

Um die einzelnen Fraktionen der Dichte-Gradienten trennen zu können, wurden die Röhrchen mit einer Nadel punktiert. Am besten eignet sich dazu eine abgesägte und zugespitzte Kanüle mit Mandrin, die durch ein Stück Moosgummi gesteckt wird, das zur besseren Haftung am Zentrifugenröhrchen gefettet wird. Mit dieser Nadel wurde der Boden des Röhrchens punktiert, der Mandrin 1 - 2 mm nach oben gestoßen, um das Punktionsloch offen zu halten und die Fraktionen daraufhin tropfenweise (je 4 - 5 Tropfen) gesammelt. Da die Tropfen, je nach Dichte der Lösung, verschieden groß sind, wurden aus jedem Röhrchen 0,2 ml herauspipettiert und mit je 3 ml aqua destillata verdünnt.

#### Linearität der Dichte-Gradienten:

Um die Linearität der Saccharose-Dichte-Gradienten zu überprüfen, wurde in den Schenkel A des Glasapparates (Abb. 2) zu der Zucker-Puffer-Lösung Nilblausulfat als Farbstoff gegeben. Die Konzentrationsabnahme von unten nach oben kann im Zentrifugenröhrchen bereits durch die Abnahme der Farbintensität nach oben gesehen werden. Nach Punktion, Auffangen und Verdünnung der einzelnen Fraktionen wurde die Nilblaukonzentration in den einzelnen Proben im Photometer Eppendorf (Durchlaufküvette, d = 1 cm) bei 578 nm gemessen. Das erlaubt auf die Linearität der Saccharose-Dichte-Gradienten zu schließen (Abb. 3).

Linearität war bei einer Füllhöhe der Zentrifugenröhrchen von 4,5 cm und den oben angegebenen Volumina im Bereich zwischen einer Konzentration von 13 % und 5 % gegeben. Bei den Vorversuchen zeigte es sich, daß noch niedrigere Dichten mit konstanter Linearität nur dann erhalten wurden, wenn die Füllhöhe gesteigert wurde, während bei unseren Bedingungen die Dichteabnahme des Gradienten unterhalb von 5 % Saccharose abflachte.

#### Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit Rotor SW 25:

Um größere Volumina von Enzymgemischen etc. auf Gradienten trennen zu können, wurden Versuche gemacht, mit einem größeren Apparat Dichte-Gradienten herzustellen. Dabei enthielt Schenkel A: Totvolumen 6 ml,

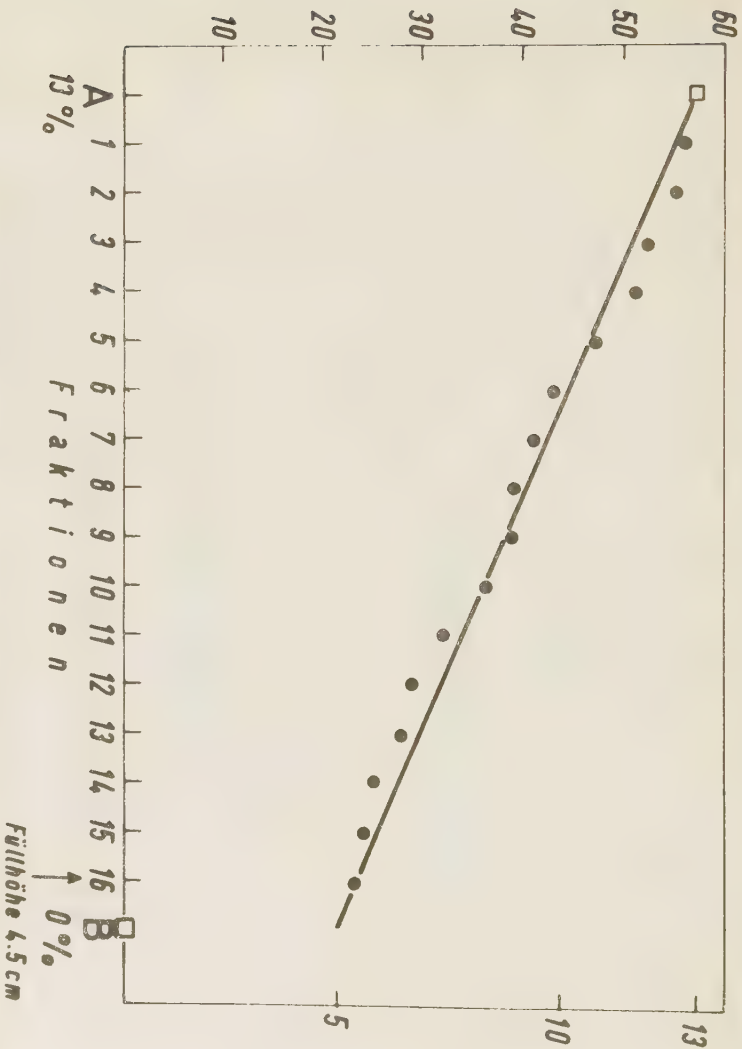


Abb. 3:

Darstellung der Linearität von Saccharose-Dichte-Gradienten nach Zusatz von Nilblausulfat

Erklärung im Text.

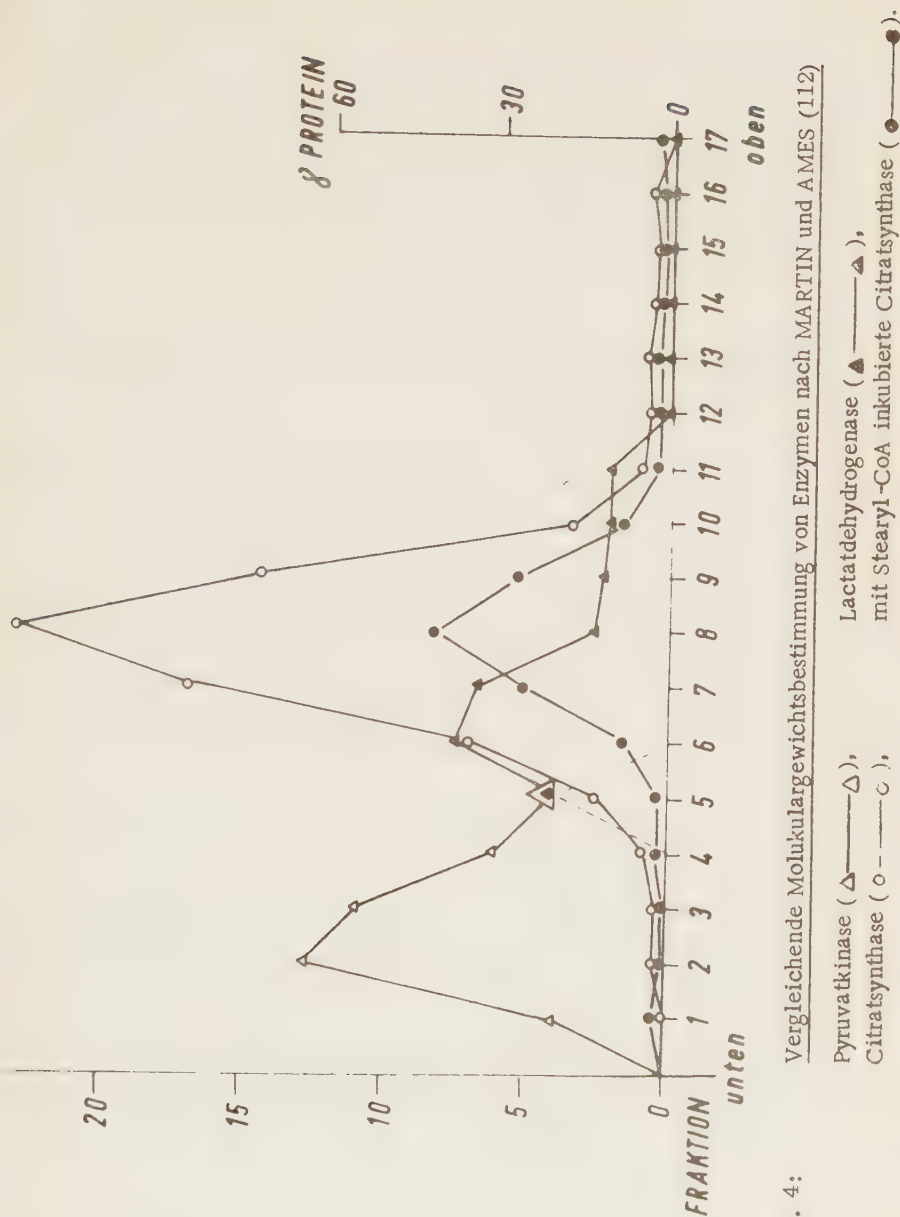


Abb. 4: Vergleichende Molekulargewichtsbestimmung von Enzymen nach MARTIN und AMES (112)

Nutzvolumen 15 ml, Schenkel B; Totvolumen 4 ml, Nutzvolumen 15 ml. Es zeigte sich jedoch beim Füllen des ca. 30 ml enthaltenden Zentrifugenröhrchen, daß ein kontinuierliches Einlaufen schwierig zu erzielen war, da der große Durchmesser ( $d = 2,5$  cm) des Zentrifugenröhrchens kein langsames Ansteigen der Füllhöhe zuläßt. Die Punktion gestaltete sich dadurch schwierig, daß die Flüssigkeitssäule im Zentrifugenröhrchen einen zu hohen Druck auf die Punktionsnadel ausübte, und so die Nadel leicht herausrutschte.

### Molekulargewichtsbestimmungen von Enzymen:

Wie bereits eingangs erwähnt, lassen sich nach MARTIN und AMES (110) durch vergleichende Dichte-Gradienten-Zentrifugation Molekulargewichte von Enzymen angenähert bestimmen.

Wir untersuchten zuerst die Sedimentationsgeschwindigkeit von Lactatdehydrogenase (LDH). Es wurden Gradienten, wie oben beschrieben, hergestellt und 2 Stunden stabilisiert. Vorsichtig wurde dann je 0,1 ml dialysierte (2 Std. gegen aqua dest.) LDH Boehringer (Muskel) auf die Gradienten pipettiert, so daß die Enzymlösungen sichtbar oben auf den Gradienten liegen blieben. Die so beschichteten Gradienten wurden 17 Stunden lang im Swing-Bucket Rotor SW 39 in der Spinco Ultrazentrifuge zentrifugiert (37 500 UPM). Nach der üblichen Punktion der Zentrifugenröhrchen erfolgte eine Proteinbestimmung nach LOWRY (113). Die Ergebnisse der Proteinbestimmung ergaben erwartungsgemäß, daß die LDH in den Gradienten gleich weit gelaufen waren.

Weiterhin wurden auf die gleiche Weise Dichte-Gradienten-Zentrifugationen von anderen Enzymproteinen durchgeführt.

Es wurden dabei Lactatdehydrogenase, Pyruvatkinase und Citratsynthese, sowie von Dr. L. Weiß (Schwabinger Krankenhaus) mit Stearyl CoA inkubierte Citratsynthese verwendet. Alle Enzyme wurden von Boehringer bezogen und vor der Zentrifugation dialysiert.

Wie Abb. 4 zeigt, entsprechen die Sedimentationswege der Enzyme den aus der Literatur bekannten Molekulargewichten. Nach der o. a. Formel lassen sich unbekannte Molekulargewichte durch Vergleich mit den parallel sedimentierten Enzymen angenähert ermitteln.

## II. PROTEINSYNTHESE IM NEBENNIERENHOMOGENAT

### 1. Homogenisation

Unter Homogenisation versteht man den mechanischen Aufschluß von Geweben, wobei die Zellen fast vollständig zerstört werden, so daß die Zellpermeabilität völlig aufgehoben ist. Durch Homogenisation und anschließende Zentrifugation können die subzellären Bestandteile der Zelle aufgeschlüsselt werden.

Wir erwähnen drei Arten der Homogenisation:

die Homogenisation an glatten Flächen (Teflonpistille im Glaskolben, Braun-Melsungen) -

die Homogenisation an rauen Flächen (Glaspistille, Braun-Melsungen) nach POTTER ELVEJHEM (114) und

die Homogenisation an scharfen Flächen (Messerhomogenisator).

Bei der Homogenisation empfiehlt es sich immer, die Gewebe zu suspendieren, eine Verdünnung 1 : 10 ist am besten. Die Homogenisationszeit soll möglichst kurz gehalten werden, um autolytische Prozesse in der Zelle und Inaktivierung von Enzymen zu verhindern. Die Homogenisationstechnik wird je nach Gewebsart und zu untersuchender Zellfraktion verschieden sein. Die besten Ergebnisse erhält man, wenn man die einzelnen Homogenisationsmethoden miteinander verbindet, z.B. zuerst grobe Zerkleinerung mit einem Messerhomogenisator, bei der auch eventuell noch vorhandene Fett- und Bindegewebsreste entfernt werden können. Danach folgt - als feinere Homogenisation - eine mechanische Zerkleinerung mit den Teflon Pistillen (der Firma Braun-Melsungen) nach POTTER ELVEJHEM (114).

Wir haben die besten Nebennieren-Homogenate erhalten wenn wir 4 x 10 sec lang mit dem Messerhomogenisator (Omni Servall Mixer 200) vorhomogenisiert haben und danach 1 - 3 min, je nach Konsistenz des Gewebes, mit den Teflon Pistillen möglichst hochtourig homogenisierten. Die Homogenisationen wurden im Kühlraum bei + 2° C durchgeführt mit zusätzlicher Kühlung der Kolben in Eis.

## 2. Fraktionierung durch Zentrifugation

Um die subzellulären Bestandteile der Gewebshomogenate zu trennen, bedient man sich der Fraktionierung durch Differential-Zentrifugation (115, 116). Es lassen sich dadurch nicht homogenisierte Zellen, Zellkerne, Mitochondrien, Mikrosomen und die sogenannte lösliche Zellfraktion trennen. Diese verschiedenen Strukturen sedimentieren verschieden schnell bei verschieden starker und verschieden langer Ultrazentrifugation.

Zuerst, d. h. nach z. B. 10 min. Zentrifugation bei  $600 \times g$ , sedimentieren die Zellkerne. Danach sedimentieren im verbliebenen Überstand die Mitochondrien, z. B. nach 15 min.  $\times 15\,000 \times g$ , dann die Mikrosomen mit ihren Bestandteilen, den Ribosomen und den Polysomen (60 - 90 min.  $\times 105\,000 \times g$ ). Der Überstand der letzten Zentrifugation wird lösliche Zellfraktion genannt (115).

Wir haben mit  $15\,000 \times g$  Überständen und  $105\,000 \times g$  Überständen gearbeitet. Den  $15\,000 \times g$  Überstand, die mikrosomenhaltige Zellfraktion, erhielten wir nach 10-minütiger Zentrifugation bei 11 300 UPM in der MSE Kühlzentrifuge (Rotor 8  $\times 50$  ml). Der  $105\,000 \times g$  Überstand wurde durch 90-minütige Zentrifugation des  $15\,000 \times g$  Überstandes bei 37 000 UPM im Rotor 40 der Spinco Ultrazentrifuge Model L erhalten. Dieser Überstand ist die lösliche Zellfraktion, die Mikrosomen befinden sich im Sediment.

## 3. Chromatographische Auftrennung der löslichen Zellfraktion

Bei den chromatographischen Verfahren werden u. a.

1. Verteilungschromatographie (z. B. Papierchromatographie)
2. Austauschchromatographie (z. B. Kationen- und Anionenaustauscher) und
3. Gaschromatographie unterschieden.

Für unsere Zwecke war die Anionen-Austauschchromatographie interessant. Verschiedene natürlich vorkommende Aluminiumsilikate besitzen die Eigenschaft, daß sie aus der umgebenden Lösung z. B. ein Anion aufnehmen und dafür eine äquivalente Menge eines anderen Anions abgeben. Man bezeichnet solche Stoffe als Ionenaustauscher. Die Ionenaustauschabsorption setzt voraus, daß vom Adsorbens ein gleichsinnig geladenes Ion an das Lösungsmittel abgegeben werden kann. Die Austauschvorgänge sind Gleichgewichtsreaktionen, die von der Konzentration der beteiligten Partner, von der Affinität der auszutauschenden Ionen zum Austauschergegenion und der Diffusionsgeschwindigkeit der austauschenden Ionen in das dreidimensionale Netz des Austauschers abhängen (117).

Wir haben mit DEAE-Sephadex (Diäthylaminoäthyl-Dextrangel) und DEAE-Cellulose Austauschern (117a) gearbeitet. Es handelt sich hierbei um organische Austauscher; Sephadex Ionenaustauscher bestehen aus einem Gerüst quervernetzter Dextransketten. Die funktionellen Gruppen sind durch Verätherung an die Glucosereste in den Polysaccharid Ketten gebunden (117). Durch die Veränderung des Vernetzungsgrades erhält man Netze verschiedener Porosität. Wir benutzten eng vernetzte Typen (G 25), bei denen nur Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 10 000 Zugang zu allen Ionen-gruppen haben, während größere Moleküle nur an der Oberfläche gebunden werden.

Die Anionenaustausch-Chromatographie mit DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex-Säulen wurde dazu benützt, die uns interessierende Aminoacyltransferase aus Schweinenebennieren anzureichern (40). Das System der Chromatographie war von TAKANAMI für die Reinigung von Leber-Aminoacyltransferase angegeben worden (36 - 38).

Bei einem typischen Versuch wurden 13,7 g frische Schweinenebennieren - etwa 1 Stunde nach der Schlachtung der Tiere - in 68,5 ml Medium M (0,25 M Saccharose, 0,025 M KCl, 0,005 M  $MgCl_2$  in 0,05 M Tris HCl Puffer pH 7,5) homogenisiert, wie oben beschrieben, und zuerst ein 10 min. x 15 000 x g Überstand - entsprechend 200 mg Nebennieren/ml Medium M - hergestellt und daraus dann ein 105 000 x g Überstand (90 min. bei 37 000 UPM Rotor 40 der Spinco Ultrazentrifuge, Beckman Instruments). Davon wurden 3 x 15 ml (ca. 75 %) auf Sephadex G 25 Säulen aufgetragen und mit Puffer I (0,03 M KCl, 0,02 M Tris HCl Puffer pH 7,5) eluiert.

Es wurden nun von jeder Säule (h = 20 cm, d = 1,2 cm), auf die der o. g. 105 000 x g Überstand aufgetragen war, 25 ml Eluat gesammelt, wobei die Absorption bei 254 nm mit dem Uvicord-Ultraviolett-Absorptionsmeter (LKB) registriert wurde. Jedes Eluat wurde darauf mit einer Ultrafiltrationsmethode (18, 118) unter Verwendung von Kollodiumhülsen der Fa. Membranfiltergesellschaft Göttingen bei einem Vakuum von ca. 50 mm Hg (Ölpumpe, Vakku-Brand) auf ca. 2 ml eingengt.

#### Kollodiumhülsen zur schonenden Einengung proteinhaltiger Lösungen:

Der Gebrauch von Kollodiumhülsen zur Einengung unseres Überstandes hat sich sehr bewährt. Die Kollodiumhülsen der Membranfiltergesellschaft dienen zur Einengung von Eiweißlösungen für elektrophoretische Untersuchungen (Liquor cerebrosinalis). Sie können an Öl- und Wasserstrahlpumpen bis zu 500 mm Hg angeschlossen werden. Wir haben ca. 10 ml Eluat/

Kollodiumhülse eingengt.

Die eingengten Konzentrate (s. o.) wurden dann 20 min. bei 37 000 UPM mit Rotor 40 der Spinco Ultrazentrifuge zentrifugiert ( $105\,000 \times g$ ), so daß eventuelle Rückstände (denaturierte Proteine), die die nachfolgend benutzte Anionen-Austauscher-Säulen verstopfen könnten, abzentrifugiert wurden. Es zeigte sich auch ein geringes Sediment, das verworfen wurde.

#### Herstellen der DEAE-Sephadex-Säulen:

Die Sephadex-Austauscher (Pharmacia, Uppsala) werden in der Salzform (Chlorid bzw. Na-Salze) geliefert. Vor der Anwendung sind sie in folgender Weise vorzubereiten:

1. Der Austauscher wird zum Quellen möglichst über Nacht in ein Gefäß mit reichlich Wasser gegeben (mindestens 15 ml Wasser pro g Trockengewicht). Wir verwandten 15 g Trockensubstanz. Die kleineren Partikel des Sephadex wurden durch mehrmaliges Dekantieren entfernt.
2. Das Gel wird nun auf einer Porzellannutsche mehrmals mit 0,5 N HCl, 0,5 N NaOH und Wasser gewaschen.
3. Anschließend folgt das Äquilibrieren mit dem für den Versuch vorgesehenen Puffer (in unserem Fall Puffer I, s. o.).

#### Arbeiten mit DEAE-Cellulose-Ionen-Austauschern:

In Vorversuchen hat sich jedoch gezeigt, daß zur weiteren Chromatographie die DEAE-Sephadex-Säule weniger geeignet ist. Der stimulierende Faktor wurde nur in unzureichender Menge angereichert, wie die Testung der Vorversuche ergab. Wir verwandten daher zur weiteren Anreicherung die DEAE-Cellulose Chromatographie.

#### Füllen der DEAE-Cellulose-Säule:

Eine Menge von 3 - 5 g wurde in 50 ml des zu Anfang der Eluation verwendeten Puffers (Puffer I, s. o.) aufgenommen. Nach 1 - 2 min. wurde von den etwa abgesetzten groben Partikeln der Überstand in einen hohen Meßzylinder abgegossen. Wir ließen die Cellulose 45 min. im Zylinder stehen. Das Sediment wurde zum Gießen der Säule verwendet, der leicht getrübbte Überstand (feine Partikel) verworfen.

Die Säule kann in einem Arbeitsgang gegossen werden; es ist nicht nötig, sie

in kleinen Portionen zu füllen. Das Adsorbens sollte auf keinen Fall, auch nicht für kurze Zeit, trocken laufen. Es wurden Säulen der Fa. Pharmacia (Höhe = 12 cm, d = 1,2 cm) benutzt. Die Tropfgeschwindigkeit war 3 Tropfen/min.

Das zentrifugierte Konzentrat des geschilderten typischen Versuchs wurde nun auf der DEAE-Cellulose-Säule mittels Gradientenelution fraktioni-  
niert. Der aufgetragene Überstand, 6 ml wurde zuerst über die Säule geschickt. Nach dem Einsickern des Überstandes wurde ein Vorlauf mit Puffer I (100 ml) angeschlossen. Die Vorlaufmenge wurde in Vorversuchen ausprobiert, und zwar wurde sie danach bemessen, nach welcher Menge das Protein des Schweinenebennieren-Überstandes im Vorlauf ausgewaschen war, wie aus dem Absinken der Kurve der Absorption bei 254 nm im Uvicord (LKB) auf Null in etwa ersichtlich war. Es stellte sich heraus, daß bei einer Vorlaufmenge von 100 ml diese Voraussetzung erfüllt wurde. Nach dem Vorlauf wurde ein Gradient aus gleichen Teilen ( je 150 ml Puffer I und Puffer II, Puffer II : 0,5 M KCl, 0,02 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5) angeschlossen dessen Linearität mit einem Leitfähigkeitsanzeigergerät überprüft wurde. Schließlich wurde noch mit 1 M KCl (50 ml) nachgewaschen. Das Eluat wurde mit einem Radi Rac (LKB) fraktioniert (41 Fraktionen à 11 ml) und die Absorption bei 254 nm mit dem Uvicord (LKB) wie oben registriert (Abb. 5).

Die Fraktionen wurden nun rekombiniert in Proben I - X und mittels Ultrafiltration in Liquoreinengungsgefäßen (s.o.) auf ca. 1 ml eingeeengt. Sämtliche Proben wurden danach gegen Medium M dialysiert und auf 2 ml mit Medium M aufgefüllt. Außerdem wurde der Proteingehalt der Proben nach LOWRY (113) ermittelt. Alle bisher angegebenen Schritte erfolgten im Kühlraum, bei 0 - 2°C. Ca. 60 Stunden nach Schlachtung der Tiere wurden aliquote Mengen der Proben I - X getestet.

# 1. Testsystem zur Messung des Einbaus von $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren in Protein:

Tab. 1: Inkubationsansatz für  $^{14}\text{C}$ -Glycin-Einbau in Protein

|                                                 |               |                                         |
|-------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------|
| $^{14}\text{C}$ -Glycin                         | 1             | $\mu\text{Ci}$ (0,014 $\mu\text{Mol}$ ) |
| Phosphoenolpyruvat PEP                          | 10            | $\mu\text{Mol}$                         |
| Adenosintriphosphat ATP                         | 1             | $\mu\text{Mol}$                         |
| Guanosintriphosphat GTP                         | 0,25          | $\mu\text{Mol}$                         |
| Pyruvatkinase                                   | ca. 60        | $\mu\text{g}$                           |
| 15 000 x g Überstand<br>von Schweinenebennieren | 80            | mg Äquivalent                           |
| Testlösung                                      | z.B. Medium M |                                         |

---

$\sum V = 1,05 \text{ ml}, \quad 37^\circ \text{C}, \quad 60 \text{ min.}$

---

In diesem Testsystem (18, 40) wurden die fraktionierten und eingeengten Proben I - X auf die Aktivität der Aminoacyltransferase getestet.

Die für das Testsystem notwendigen Aminosäure-Cofaktoren und Enzym-lösungen wurden entweder frisch bereitet oder bei  $-18^\circ \text{C}$  tiefgefroren aufbewahrt. Die zu testenden Proben und der 15 000 x g Überstand von Schweinenebennieren (= mikrosomenhaltige Zellfraktion) sind jedoch nicht eingefroren haltbar, sie behalten ihre Aktivität für Tage bzw. Stunden bei  $0^\circ \text{C}$ . Die  $^{14}\text{C}$ -Glycin-Lösungen mußten tiefgefroren aufbewahrt werden, denn andernfalls verändern Bakterien die Substanz so, daß sie bei Trichloressigsäure-Fällung wie ein Eiweißkörper reagiert und bei der Inkubation die "Blindwerte" im Sinne einer Erhöhung verändert.  $^{14}\text{C}$ -Glycin wurde vom Radiochemical Centre Amersham, England, bezogen. Es wurde bei uns mit Medium M verdünnt, so daß die Endverdünnung 10  $\mu\text{Ci/ml}$  Medium M er-ab. Die Pyruvatkinase (Boehringer) wurde 2 Stunden gegen Wasser in der Kälte dialysiert. ATP und GTP, die im Überschuß zugeführt wurden, wurden vor jedem Testansatz frisch zubereitet.

Die Inkubationsansätze wurden 60 min. in Inkubationsröhrchen mit Schraubverschluß bei  $37^\circ \text{C}$  im Schüttelbad der Fa. Köttermann inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zu dem Inkubationsgemisch 4 ml eiskaltes

Wasser und 5 ml frische kalte 20 % Trichloressigsäure gegeben. Nach 15 Minuten wurden die denaturierten Proteine durch Zentrifugation bei 1 200 x g sedimentiert, der Überstand abgesaugt und das Sediment folgender Waschprozedur unterworfen:

je 1 x 5 ml eiskalten absoluten Alkohol, 2 x 10 ml 5 % Trichloressigsäure - jeweils für 15 min. bei 90<sup>0</sup> C im Wasserbad erhitzt - zur Extraction der Nucleinsäuren (119), danach jeweils Abkühlung 5 min., daraufhin 1 x 10 ml kalte 5 % Trichloressigsäure, 1 x 10 ml Aethylacetat zur Lipidextraction und 1 x 10 ml absoluten Alkohol zur Trocknung des Sediments (18, 40). Bei jedem Waschvorgang erfolgte Aufwirbeln des Sediments und Zentrifugation (3 000 UPM bei 1 200 x g).

Die Proteinrückstände wurden im Exsiccator unter dem Vakuum einer Wasserstrahlpumpe getrocknet (ca. 30 min.), über Nacht in 2 ml Hyaminehydroxide (Fa. Packard) bei 60<sup>0</sup> C aufgelöst und schließlich mit 18 ml Scintillationsflüssigkeit (0,3 % PPO = 2,5-diphenyloxazol, 0,06 % POPOP = 1,4-bis 2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol in Toluol) in Zählgläser überführt und im Flüssigkeitsscintillationszähler (Tricarb Packard Instruments) bei einer Zählausbeute von ca. 65 % gezählt. Zur Verminderung eines Farb-Quenches wurde die Scintillationsflüssigkeitsmenge so hoch gewählt, da durch eine größere Verdünnung eventuell auftretende farbliche Veränderungen in tragbarer Breite gehalten werden (Korrekturfaktor unter 1,3). Es empfiehlt sich, die Überführung des gelösten Sedimentes im Dunkeln vorzunehmen, um eine etwaige Anregung der Zählgläser durch UV-Licht zu vermeiden und dadurch Änderungen der Impulszahl auszuschließen.

Blindwerte, d.h. Ansätze, die nicht inkubiert wurden und denen sofort nach Ansatz Trichloressigsäure und Wasser zugesetzt wurde, liefen bei jedem Versuch mit und wurden von den Ergebnissen abgezogen. Ebenso wurden Blindwerte, die die Impulszahl des Hyamines und der Scintillationsflüssigkeit angeben, von den erhaltenen Impulszahlen subtrahiert.

Bei der Testung der Verteilung der stimulierenden Aktivität der löslichen Zellfraktion von Schweinenebnennieren in dem hier mitgeteilten typischen Versuch nach DEAE-Cellulose Austausch Chromatographie zeigte sich, daß die Aktivität sich vor allem in Probe VI und VII fand (Abb. 5).

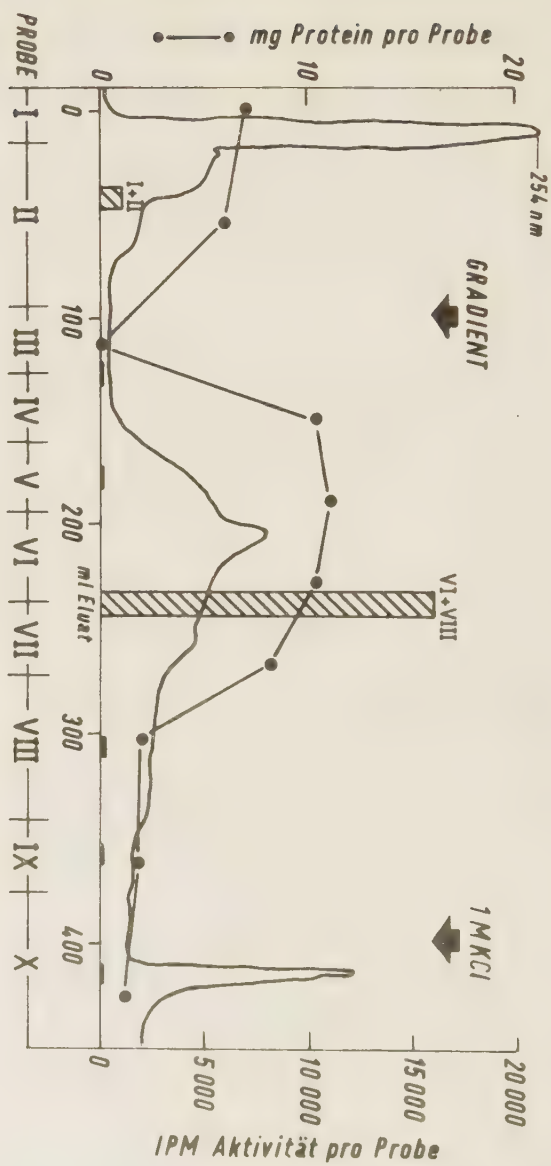


Abb. 5: DEAE-Cellulose-Chromatographie von Aminoacyltransferase aus Schweineebenennieren  
Die stimulierende Aktivität der löslichen Zellfraktion befand sich vor allem in Probe VI und VII.  
Es wurde außerdem noch die Absorption bei 254 nm und der Proteingehalt in mg pro Probe gezeigt.

### III. POLYSOMEN - RIBOSOMEN

Mikrosomen sind Bruchstücke des Ergastoplasmas der Zelle (115, 116). Mikrosomen können - wie bereits erwähnt - nach Homogenisation in isotonen Rohrzuckerlösungen, die zur Erhaltung der Mitochondrienstruktur angewandt wurden (120), durch Differential-Zentrifugation bei 105 000 x g sedimentiert werden. Durch Desoxycholatzusatz können aus den Mikrosomen die Ribosomen isoliert werden (121 - 124). Der Quotient Ribonucleinsäure zu Protein beträgt bei Mikrosomen 0,25, bei Ribosomen 1,0 (122, 124). Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß Penta- bis Heptamere von  $^{73}\text{S}$  Ribosomen, welche auch Polysomen oder Ergosomen genannt werden, wesentlich aktiver als die Monomeren  $^{73}\text{S}$  Ribosomen Aminosäuren in Eiweiß einbauen (125 - 128).

1. Zuerst ging es uns, wie in der Einleitung beschrieben, darum, Polysomen und Ribosomen zu präparieren. Nach dem Vorschlag von WETTSTEIN und Mitarbeitern (128) wurden Homogenate von frischen Schweinenebennieren (200 mg SNN/ml Medium M) hergestellt. Die Homogenisation erfolgte wie bereits beschrieben. Es war möglich, auch Schweinenebennieren zu nehmen, die tiefgefroren aufbewahrt worden waren. Die Nebennieren sollten jedoch bereits beim Herausnehmen aus den frisch geschlachteten Tieren von Fett und Bindegewebe vollständig befreit und möglichst kapsellos eingefroren sein.

Ein Teil 10 % Natriumdesoxycholat in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,2 wurde zu neun Teilen 15 000 x g Überstand des o. g. Homogenats in der Kälte vorsichtig unter Rühren gegeben. Dann wurde der so behandelte Überstand (4,5 ml) im Eisbad auf 2,25 ml 2 M Saccharose (+ Elektrolyte wie in Medium M) und 2,25 ml 0,5 M Saccharose (+ Elektrolyte wie in Medium M) (Abb. 6) in Cellulose Nitrate Tubes Nr. 302 235 der Fa. Beckman Instruments geschichtet. Daraufhin wurden die Röhrchen 4 Stunden im Rotor 40 der Spinco Ultrazentrifuge Model L bei 37 500 UPM zentrifugiert. In dem dadurch entstandenen 105 000 x g Sediment befinden sich die Polysomen (Abb. 6). Das Sediment ist gelartig, bräunlich-gelblich durchscheinend. Der Überstand, der restliches Fett, Proteine und einen Rest des 15 000 x g Überstandes enthielt, wurde abgesaugt. Das Sediment wurde in 0,5 ml Medium M durch vorsichtiges und ganz kurzes Plümpern mit einem Teflon Pistill aufgelöst und, wenn es nicht sofort verbraucht wurde, eingefroren. Wenn die Polysomen zum Einbau von Aminosäuren in Eiweiß verwendet wurden, durften sie nicht eingefroren werden, denn ihre Aktivität ging dadurch verloren. Zur Proteinbestimmung und RNS-Bestimmung konnten sie auch eingefroren verwendet werden.

**4 Std.  
zentrifugieren**

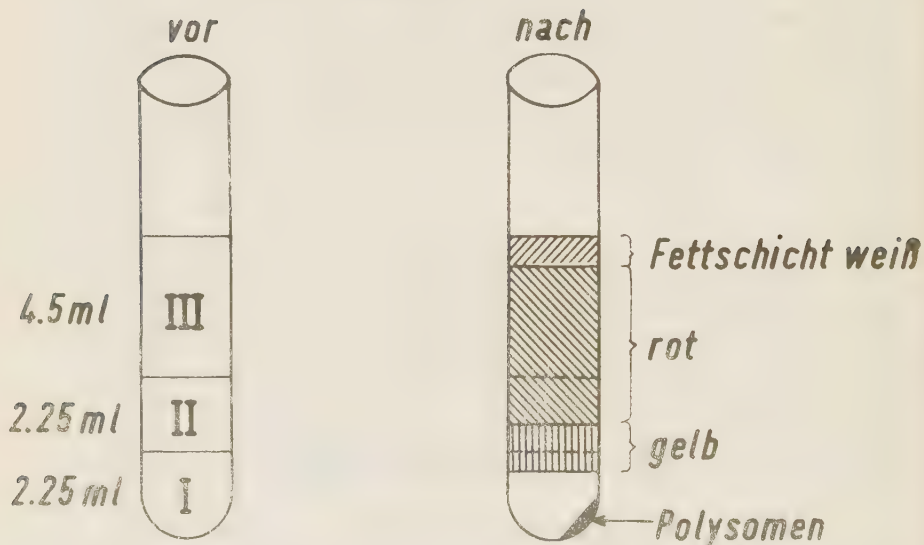


Abb. 6:

Schematische Darstellung der Präparation von Polysomen

Es wurden auf 2,25 ml Lösung I (2 M Saccharose, 0,005 M  $MgCl_2$ , 0,025 M KCl, 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5) und 2,25 ml Lösung II (0,5 M Saccharose, Elektrolyte wie oben) vorsichtig 4,5 ml Lösung III (NaDOC-behandelter 15 000 x g Überstand von Schweine Nebennierenhomogenaten) geschichtet. Weitere Erklärung siehe Text.

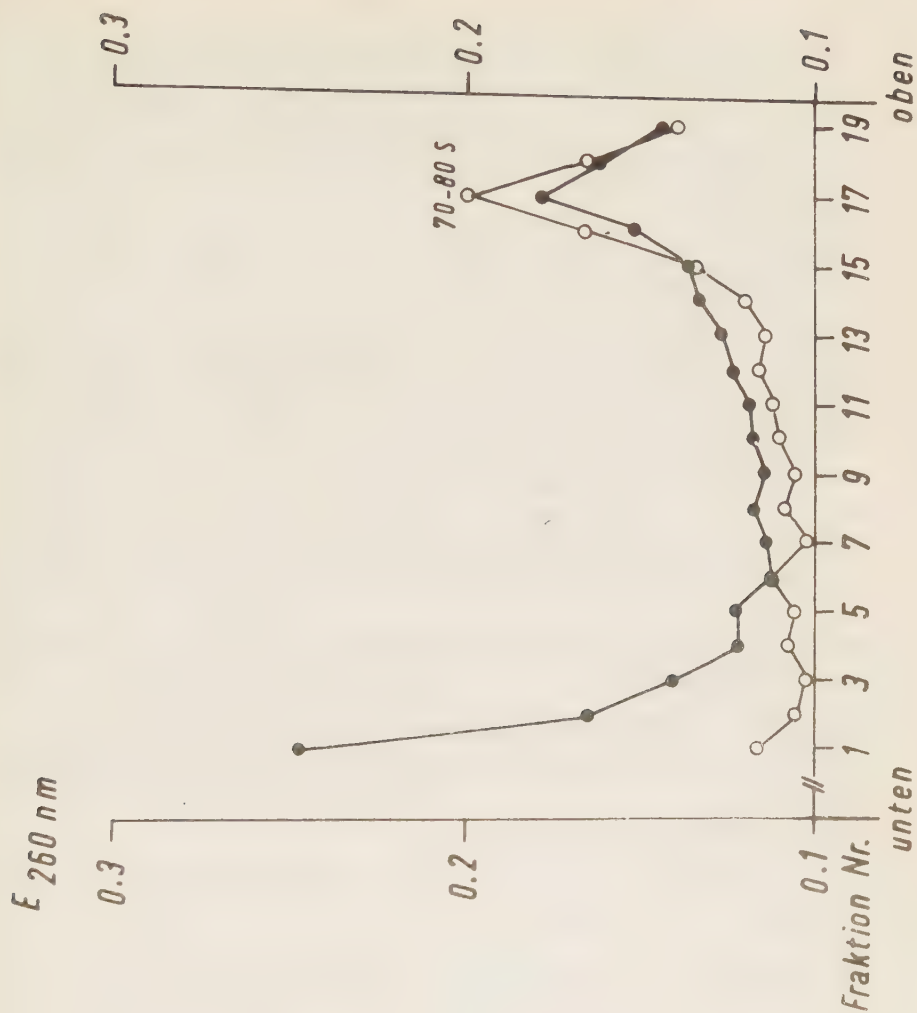


Abb. 7: Dichte-Gradienten-Zentrifugation von Polysomen ( ●—● )  
und Ribosomen ( ○—○ )

Erklärung siehe Text.

Die Ribosomen wurden auf ähnliche Weise wie die Polysomen präpariert. Man schichtete den mit Natriumdesoxycholat behandelten 15 000 x g Überstand (4,5 ml) auf 4,5 ml 1 M Saccharose, 0,005 M  $MgCl_2$ , 0,025 M KCl und 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5. Zentrifugiert wurde wie oben beschrieben. Lösen des Sediments erfolgte in ebenfalls 0,5 ml Medium M pro Röhrchen unter Plümpern.

## 2. Proteinbestimmung nach LOWRY

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in Polysomen, wie auch des 105 000 x g Überstandes von Schweinenebennieren wurde die Methode von LOWRY (113) angewendet. Als Proteinstandard nahmen wir einen Serumproteinstandard, der durch die oben beschriebene Waschprozedur (Trichloressigsäure, Alkohol und Äthylacetat) gewonnen und mit dem jedes Mal eine Eichkurve angelegt wurde.

Es handelt sich bei dieser Bestimmung um eine photometrische Bestimmung mit Hilfe des Folin-Ciocalteus-Reagens (Phenol-Reagens).

Die Extinktion wird im Photometer Eppendorf bei 492 nm oder besser bei 578 nm gemessen.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in Polysomen mußte das Polysomen-sediment in Wasser gelöst werden, da das Lösen in Medium M die Werte verändert.

Die Bestimmung ergab folgende Werte:

In 0,1 ml Polysomen, die 160 mg frischen Schweinenebennieren entsprechen, fanden sich 0,78 mg Protein.

## 3. RNS-Bestimmung nach SCHNEIDER und DISCHE (119, 119 a)

Um den Gehalt von Ribonucleinsäuren in Polysomen zu bestimmen, bedient man sich folgender Methode:

Zu jeder Bestimmung wurde eine Eichkurve angelegt, die aus einem RNS-Standard gewonnen wurde. Die Ribonucleinsäure wurde zur besseren Lösung in 5 % TCE auf ca. 90° C erwärmt. Dabei wurden die Nucleinsäuren durch hydrolytische Spaltung in Nucleotide gespalten und gelöst. Auf die gleiche Weise wurden die Polysomen vorbereitet. Als Reagenzien wurden Orcinol und Eisen-3-Chlorid in konz. HCl verwendet. Die Extinktion wurde ebenfalls im Photometer Eppendorf bei 578 nm gemessen.

Ergebnis: In 0,1 ml Polysomen, die 160 mg frischen Schweinenebennieren entsprachen, fanden sich etwa 1,8 mg RNS.

#### 4. Dichte-Gradienten-Zentrifugation von Polysomen und Ribosomen

Zur Charakterisierung von Polysomen und Ribosomen wurden diese wie vorher eingehend beschrieben, auf Saccharose-Dichte-Gradienten gelagert und ihre Sedimentation bzw. die Absorption der Fraktionen der Dichte-Gradienten im Spektralphotometer PMQ II von Zeiss bei 260 und 280 nm gemessen.

Die Gradienten wurden wie üblich hergestellt und stabilisiert. Die Polysomen und Ribosomen wurden wie oben angegeben präpariert und in 1 ml saccharose-freiem Medium gelöst, da die Dichte des Medium M mit 0,25 M Saccharose zu groß für die oberen Schichten des Gradienten gewesen wäre. Es wurden nun je 0,2 ml Polysomen und Ribosomen auf die Gradienten gelagert und diese im Rotor SW 39 bei 37 500 UPM 20 min. zentrifugiert. Dann wurden 18 - 20 Fraktionen gesammelt und die Absorption nach Verdünnung 1 : 15 gemessen (Abb. 7).

Gezeigt ist die Absorption bei 260 nm. Die Polysomen (Punkte) weisen vermutlich durch Desintegration bei der Präparation entstandene Ribosomen (70 - 80 S), sowie eine höhere Absorption in den Fraktionen Nr. 10 - 16 auf. Ferner findet sich bei den Polysomen (Fraktion 1 - 3), nicht aber bei den Ribosomen (Kreise), ein Sediment, das vermutlich aus noch konglomerierten, aber aktiven Polysomen besteht (44).

#### IV. INKUBATION VON POLYSOMEN UND AMINOACYLTRANSFERASE

Bei diesen Versuchen sollte, wie in der Einleitung ausgeführt, geprüft werden, welche Rolle die Aminoacyltransferase für den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren in Protein mit und ohne Stimulierung von Aminoacyltransferase durch Polysomen spielt. Da Polysomen, wie erwähnt, aus Messenger-RNS und mehreren Ribosomen bestehen, konnte hier die Wirkung steigender Mengen von Aminoacyltransferase bei konstant gehaltener Menge an m-RNS untersucht werden.

Wir maßen den  $^{14}\text{C}$ -Glycin Einbau durch Polysomen bei Inkubation mit 105 000 x g Überstand von Schweinenebennieren unter Stimulierung durch Aminoacyltransferase. Die Präparation oder Anreicherung der einzelnen Faktoren, die zur Inkubation gebraucht wurden, wurde bereits beschrieben.

Es wurden zunächst Versuche gemacht, die stimulierende Wirkung der Polysomen bei konstanter Menge an 105 000 x g Überstand (lösliche Zelifraktion) zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, daß bei zunehmender Menge Polysomen zunehmend mehr Aminosäure in Protein eingebaut wurde. Die Stimulierung war allerdings keineswegs proportional zur zugesetzten Polysomenmenge.

Wir erhielten in einem typischen Versuch:

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| 0,1 ml Polysomen zugesetzt | 29 IPM |
| 0,2 ml Polysomen zugesetzt | 68 IPM |
| 0,4 ml Polysomen zugesetzt | 97 IPM |

Bei den angegebenen Werten sind die IPM, die durch den 105 000 x g Überstand allein eingebaut wurden, abgezogen. Die Inkubationsbedingungen entsprachen im übrigen denen, die bei der Testung des geschwindigkeitsbestimmenden Faktors aus der Cellulose Chromatographie angegeben wurden (Tab. 1). Der 15 000 x g Überstand wurde weggelassen und stattdessen Polysomen eingesetzt.

Tab. 2 zeigt nun, daß für den in vitro Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Glycin durch konstante Mengen Polysomen die Menge an zugesetzter Aminoacyltransferase geschwindigkeitsbestimmend ist. Es wurde, wie oben beschrieben, die Anreicherung der Aminoacyltransferase durch DEAE-Cellulose Chromatographie vorgenommen. Gleichzeitig wurden Polysomen wie beschrieben präpariert. Die Polysomen mußten frisch, d. h. nicht eingefroren, verwendet werden,

da sie sonst an Aktivität verloren. Der 105 000 x g Überstand, der als Quelle der weiteren, nicht geschwindigkeitsbestimmenden Faktoren zugesetzt wurde, stammte von eingefrorenen Schweinenebennieren. Es wurden jeweils 0,3 ml 105 000 x g Überstand entsprechend 60 mg Äquivalent, und 0,1 ml Polysomen entsprechend 160 mg frischen Schweinenebennieren, 0,78 mg Protein (LOWRY) und ca. 1,8 mg RNS (119, 119a) - pro Ansatz inkubiert. Die Gewinnung der Aminoacyltransferase wurde bereits eingehend beschrieben. Es wurden von den Proben V - IX (Abb. 5) jeweils 0,2 ml und 0,4 ml getestet bzw. zugesetzt: Von diesen enthielten: V: 3,8 mg, VI: 3,5 mg, VII: 2,8 mg, VIII: 0,33 mg, IX: 0,3 mg Protein/ml. Im übrigen wurden die oben beschriebenen Inkubationsbedingungen des Testsystems ohne 15 000 x g Überstand (Tab. 1) angewendet. Auf das Gesamtvolumen der Inkubation ( $\Sigma$  V = 1,05 ml) wurde, wenn nötig, mit Medium M aufgefüllt.

Man ersieht aus Tab. 2, daß der Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Glycin durch Polysomen in etwa proportional zur zugesetzten Menge an Aminoacyltransferase (Proben VI - VII) ist.

Tab. 2:  $^{14}\text{C}$ -Glycin-Einbau durch Polysomen, Stimulierung durch Aminoacyltransferase

| Probe Nr.<br>(Abb. 5) | Polysomen | Probe eingesetzt |        |
|-----------------------|-----------|------------------|--------|
|                       |           | 0,2 ml           | 0,4 ml |
| V                     | +         | 270              | 208    |
|                       | -         | 55               | Ø      |
| VI                    | +         | 515              | 1288   |
|                       | -         | 176              | Ø      |
| VII                   | +         | 754              | 1835   |
|                       | -         | 342              | Ø      |
| VIII                  | +         | 210              | 331    |
|                       | -         | 108              | Ø      |
| IX                    | +         | 255              | Ø      |
|                       | -         | 206              | Ø      |

## V. VERSUCHE ÜBER BEZIEHUNGEN ZWISCHEN CORTICOIDSYNTHESE UND PROTEINSYNTHESE IN DER NEBENNIERE

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist für die Frage nach dem biochemischen Wirkungsmechanismus von ACTH von Bedeutung, ob die Stimulierung der Proteinsynthese mit der Stimulierung der Corticoidsynthese kausal verknüpft ist. Um diese Frage anzugehen, untersuchten wir die Proteinsynthese und die Corticoidsynthese der Nebenniere 24 Stunden und 8 Tage nach Hypophys-ektomie mit und ohne ACTH Stimulierung.

Es wurden 26 Ratten hypophysektomiert und davon 10 Ratten zur Untersuchung nach 24 Stunden und 16 Ratten zur Untersuchung nach 8 Tagen verwandt. Diese Experimente wurden zusammen mit F. Kluge (129) vorgenommen. Die Ratten wurden einheitlich mit Altromin Rattenfutter, Wasser und isotonen Kochsalzlösungen ad libidum ernährt. Die Ratten hatten alle ungefähr das gleiche Gewicht (ca. 120 g) und lebten unter den gleichen Bedingungen (ca. 30° C Wärme).

### Proteinsynthese und Corticoidsynthese 34 Stunden nach Hypophysektomie

24 Stunden nach Hypophysektomie bekamen 5 Tiere je 5 E Depot ACTH (Ciba, Ba 36 716) i. m. und die anderen 5 Tiere Placebo Injektionen (isotone Kochsalzlösung). 8 Stunden später erhielten die Tiere noch einmal die gleiche Dosis. 2 Stunden später wurden unter intraperitonealer Avertin Narkose bei 8 heparinisierten (50 IE Vetren<sup>R</sup>/100 g Ratte) Tieren (4 ACTH behandelte Tiere, 4 Placebo Tiere) über die Vena femoralis die Nebennierenvenen kanüliert und 4 min. lang durch Katheter Blut zur Corticosteron-Bestimmung entnommen. Nach der Blutentnahme wurden die Ratten mit einer Guillotine dekapitiert, die Nebennieren entnommen und sofort in eiskalte 0,9 % NaCl Lösung gelegt. Bereits beim Herauspräparieren der Nebennieren sah man bei den ACTH behandelten Tieren, daß diese Nebennieren etwas größer und blutgefüllter waren als die der unbehandelten, deren Nebennieren blasser und kleiner waren.

Die Nebennieren wurden gewogen (ACTH Tiere 300 mg, Kontroll-Tiere 150 mg) und genau gleich lang in der Kälte (0° C) homogenisiert (2 x 10 sek. nach POTTER ELVEJHEM). Aus diesen Nebennierenhomogenaten wurde ein 105 000 x g Überstand durch 90 min. Zentrifugation bei 37 000 UPM Rotor 40 Spinco Ultrazentrifuge hergestellt. Diese Überstände (lösliche Zellfraktion) wurden mit <sup>14</sup>C-Glycin und 15 000 x g Überstand

(mikrosomenhaltige Zellfraktion) von eingefrorenen Schweinenebennieren in dem bereits beschriebenen Inkubationsansatz (Tab. 1) inkubiert.

Das Ergebnis (Tab. 3) zeigt, daß die fluorimetrisch bestimmten Corticosteron-Werte bei den nicht behandelten Tieren unter die Werte der Basissekretion abgesunken waren, während sie bei den durch ACTH stimulierten Tieren auf Werte mit ca. 0,3 gamma pro 4 min fast um 2 Zehnerpotenzen angestiegen waren (Versuche mit F. Kluge, 18, 129).

Tab. 3: Einfluß von ACTH auf die Corticosteronausschüttung in die Nebennierenvene 4 Stunden nach Hypophysektomie

|      |               |            |             |
|------|---------------|------------|-------------|
| ACTH | (0,093 gamma) | Kontrollen | 0,006 gamma |
|      | 0,315 gamma   |            | 0,005 gamma |
|      | 0,290 gamma   |            | 0,008 gamma |
|      | 0,320 gamma   |            | 0,005 gamma |

Es ist bekannt, daß die Corticosteronsynthese in der Nebenniere der Ratte 60 - 90 Minuten nach Hypophysektomie auf eine Basissekretion absinkt (1, 2, 18, 105, 129, 130). Dagegen führt der Stress der Hypophysektomie zu einer mindestens 30-stündigen Steigerung der in vitro Proteinsynthese bzw. der für den  $^{14}\text{C}$ -Glycin Einbau geschwindigkeitsbestimmenden Aktivität der löslichen Zellfraktion, die auch durch zusätzliche ACTH-Behandlung (s. o.) nicht erhöht werden konnte (18). So wurden unter o. g. Bedingungen für den  $^{14}\text{C}$ -Glycin Einbau durch die mikrosomenhaltige Zellfraktion von Schweinenebennieren (15 000 x g Überstand) allein 44 IPM gefunden. Bei Zusatz der löslichen Zellfraktion fanden sich in Bestätigung früherer Versuche (107) 208 IPM bei ACTH-Tieren gegenüber 195 IPM bei Kontrollen (jeweils Dreifachbestimmungen).

#### Corticosteroidsynthese und Proteinsynthese 8 Tage nach Hypophysektomie

Die anderen 16 hypophysektomierten Ratten wurden wie oben beschrieben ernährt und alle 24 Stunden mit Dexamethason (Dexascheron) 0,01 mg/Ratte und Desoxycorticosteron (Cortiron, Schering A. G.) 0,1 mg/Ratte substituiert. Am Vorabend des Versuchs wurden die Ratten nicht mehr mit den genannten Präparaten, sondern nun mit je 5 IE ACTH behandelt. 8 Ratten wurden behandelt, 8 Ratten erhielten Placeboinjektionen. 8 Stunden später wurde noch einmal die gleiche ACTH-Dosis gegeben. Für die fluorimetrische Corticosteronbestimmung (129) wurde 2 Stunden später Blut durch

Kanülierung der Nebennierenvenen bei 5 ACTH Tieren und 4 Kontrolltieren entnommen. Bei 3 weiteren ACTH-Tieren und ebenso bei den 4 übrigen Kontrolltieren wurde außerdem durch Punktion des linken Ventrikels Herzblut zur Corticosteronbestimmung genommen. Darauf folgte wieder die Dekapitation der Tiere und Entnahme der Nebennieren. Auch dieses Mal sah man den Unterschied zwischen den behandelten und Kontrolltieren deutlich. Den prallen, dunkelroten ACTH Nebennieren standen blasse, atrophische Kontrollnebennieren gegenüber.

Nach den Ergebnissen in Tab. 4 a) war die Corticoidsynthese 8 Tage nach Hypophysektomie etwa um eine Zehnerpotenz durch ACTH zu steigern, wobei die Ausschüttung in die Nebennierenvene nach ACTH aber doch um eine Zehnerpotenz unter den Werten 24 Stunden nach Hypophysektomie blieb.

Die für die in vitro Proteinsynthese geschwindigkeitsbestimmende Aktivität der löslichen Zellfraktion (105 000 x g Überstand) nimmt aber bei ACTH-Behandlung in den Nebennieren auf das Doppelte zu. Es war also die Aminoacyltransferase durch ACTH wie üblich (40)stimulierbar, während die Corticoidsynthese gegen ACTH relativ refraktär erschien.

Tab. 4 a) Corticosteronausschüttung in die Nebennierenvene pro 4 Minuten  
b) Corticosterongehalt pro ml Herzblut

|         |               |            |             |
|---------|---------------|------------|-------------|
| a) ACTH | (0,115 gamma) | Kontrollen | 0,001 gamma |
|         | 0,035 gamma   |            | 0,002 gamma |
|         | 0,042 gamma   |            | 0,002 gamma |
|         | 0,038 gamma   |            | 0,008 gamma |
|         | 0,043 gamma   |            |             |
| b) ACTH | 0,013 gamma   | Kontrollen | 0,003 gamma |
|         | 0,012 gamma   |            | 0,006 gamma |
|         | 0,022 gamma   |            | 0,004 gamma |
|         |               |            | 0,002 gamma |

Es fand sich bei Inkubation von mikrosomenhaltiger Zellfraktion von Schweinebennieren (15 000 x g Überstand) allein ein Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Glycin in Höhe von 23 IPM, während bei Zusatz von löslicher Zellfraktion der Rattenbennieren (105 000 x g Überstand) von ACTH Tieren 246 IPM und von Kontrolltieren 107 IPM gefunden wurden (jeweils Dreifachbestimmungen).

Aus diesen Ergebnissen kann man den Schluß ziehen, daß die Proteinsynthese nicht nur im Zusammenhang mit der Corticoidsynthese stimulierbar durch ACTH ist, sondern daß ACTH unter bestimmten Bedingungen verschieden stark auf die beiden Stoffwechselvorgänge wirkt.

## DISKUSSION

FARESE und REDDY (19) hatten früher gezeigt, daß die Bildung von Aminoacyl-Transfer-Ribonucleinsäure in Rattennebennierenhomogenaten durch in vivo ACTH-Behandlung zu stimulieren war. Später kam FARESE (89) jedoch zu dem Ergebnis, daß nach ACTH-Behandlung die Aktivität der Mikrosomen für den  $^{14}\text{C}$ -Glycin-Einbau zunimmt und nicht, wie ursprünglich angegeben (19), gleichbleibt. Aus unseren Untersuchungen (39, 40) ergab sich, daß der Faktor, der für die Proteinsynthese geschwindigkeitsbestimmend ist, nach seinem chemischen Verhalten, Inaktivierung durch Trypsin und bei  $55^{\circ}\text{C}$ , Stabilität gegen Ribonuclease, Molekulargewicht und Sedimentationskonstante, chromatographisches Verhalten auf DEAE-Cellulose-Säulen und Proteinnatur wahrscheinlich eine Aminoacyltransferase ist. Wir fanden jetzt, daß bei der Inkubation von Polysomen, die aus  $15\,000 \times \text{g}$  Überstand von Schweinenebennieren gewonnen wurden, mit  $105\,000 \times \text{g}$  Überstand, welche die Menge Aminoacyl-t-RNS, die für die Proteinsynthese notwendig war, in genügender Menge synthetisierte, der Aminosäure-Einbau in Protein durch den von uns als Aminoacyltransferase charakterisierten Faktor linear zur zugesetzten Menge stimuliert wurde.

Hier muß kurz auf die zeitliche Reihenfolge der einzelnen ACTH-Effekte und das Zusammenwirken vieler einzelner Mechanismen eingegangen werden. Nach FARESE (43, 44) dürfen wir annehmen, daß ACTH die Proteinsynthese, als Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren erfaßt, im Nebennierenhomogenat beschleunigt, indem zuerst die Aktivität an Aminoacyltransferase in der Nebenniere gesteigert wird und später die Aktivität und Menge der Polysomen, die als Polymere von Ribosomen und m-RNS anzu sehen sind, ansteigt, für die jedoch nach den hier vorliegenden Untersuchungen der Gehalt an Aminoacyltransferase weiter geschwindigkeitsbestimmend bleibt. Denkbar ist sowohl eine Aktivitäts- oder Mengenzunahme, also Neusynthese der Aminoacyltransferase; diese Frage wurde bisher aber noch nicht geklärt.

Fraglich bleibt weiterhin, ob ACTH die Aktivität oder den Gehalt an Enzymen, die für die Steroidsynthese notwendig sind, beeinflussen kann.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, schlossen FERGUSON und andere Autoren (98 - 101) aus Versuchen, bei denen die Proteinsynthese durch Puromycin blockiert wurde und daraufhin die Corticoidsynthese durch ACTH-Gaben nicht zu stimulieren war, daß ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Corticoid- und Proteinsynthese bestehe. Interessant dabei ist, daß

einerseits Puromycin den Transfer von Aminoacylgruppen von Aminoacyl-t-Ribonucleinsäure auf Polysomen blockiert und andererseits der geschwindigkeitsbestimmende Faktor der Proteinsynthese im Nebennierenhomogenat dieser Aminoacyltransferase ist, ein Schritt in der Biochemie der Proteinsynthese, der durch ACTH-Behandlung der Tiere beschleunigt werden kann. Dagegen ist bei Blockierung der Nucleinsäuresynthese durch Actinomycin die Steigerung der Corticoidsynthese durch ACTH nicht gehemmt (101).

Die Auffassung von FERGUSON kann nach den Ergebnissen, die wir erhalten haben, nicht bestätigt werden. Bei frisch hypophysektomierten Ratten war es uns möglich, die Corticosteronausschüttung durch ACTH-Gaben zu beschleunigen, während die Aktivität der für den Aminosäure-Einbau in Protein geschwindigkeitsbestimmenden Aminoacyltransferase nicht zu steigern war. Dreißig Stunden nach Hypophysektomie war die Proteinsynthese durch den Stress der Hypophysektomie noch stimuliert und durch ACTH-Gabe nicht weiter zu steigern, während die Corticosteroidinkretion längst abgefallen war. - Dagegen war 14 Tage nach Hypophysektomie die Aktivität der Aminoacyltransferase durch ACTH zu verdoppeln, die Corticoidsynthese gegen ACTH-Zugabe jedoch fast refraktär.

Es war daraus zu schließen, daß die Corticosteroidsynthese nicht auf einer Beschleunigung der Gesamtproteinsynthese der Nebenniere durch ACTH beruht. - Dazu paßt, daß andere Autoren bei in vitro Versuchen, bei denen Nebennierenrindenschnitte mit ACTH inkubiert wurden, fanden, daß die Corticosteroidsynthese beschleunigt wurde, während die Aminosäureinkorporation in Protein nicht zunahm, bzw. sogar abfiel (16, 17). Auch in unserem Laboratorium wurde in vitro eine Steigerung der Corticosteronsynthese, bei Abnahme des Aminosäure-Einbaus in Protein gefunden (18).

ACTH hat vielleicht nicht nur eine Primärwirkung, auf die alle Wirkungen in der Nebenniere folgen, sondern unter Umständen mehrere voneinander unabhängige Effekte. So wird in der Literatur auch zwischen Soforteffekten auf die Corticosteroidsynthese, bzw. -Ausschüttung und Späteffekten, wie z.B. der "adrenocorticotropen" Wirkung auf das Gewicht sowie den Gehalt an Protein, Ribonucleinsäure und Desoxyribonucleinsäure der Nebenniere unterschieden. So ungeklärt der biochemische Mechanismus der ACTH-Wirkung auf die Nebenniere letztlich noch ist, so sollten diese Untersuchungen doch einen Beitrag zu den Fragen nach dem biochemischen Mechanismus der Stimulation der Nebennierenproteinsynthese durch ACTH und nach der Bedeutung der Nebennierenproteinsynthese für die Steigerung der Corticosteroidsynthese durch ACTH sein.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus Schweinenebennieren wurden mittels Gradienten-Zentrifugation Polysomen präpariert, welche als Polymere von Ribosomen und je einem Molekül Messenger-Ribonucleinsäure aufzufassen sind. Ebenfalls aus Schweinenebennieren wurde durch DEAE-Cellulose-Chromatographie (Gradienten-Elution) aus der löslichen Zellfraktion eine Aminoacyltransferase angereichert. Bei der Inkubation konstanter Mengen von Polysomen, also konstanter Menge von Messenger-Ribonucleinsäure, mit steigenden Mengen Aminoacyltransferase wurde linear zur zugesetzten Menge der Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Glycin in Protein beschleunigt. Unter diesen Bedingungen war die Aminoacyltransferase-Aktivität, die durch die in vivo ACTH-Behandlung von Ratten in der löslichen Zellfraktion der Nebennieren vermehrt wird, also der für die Proteinsynthese durch Polysomen geschwindigkeitsbestimmende Faktor.
2. Bei hypophysektomierten Ratten wurde der Einfluß von ACTH auf die Corticosteroidsynthese und Proteinsynthese verglichen. Die Ergebnisse zeigen, daß die Steigerung der Corticosteroidsynthese und der für den  $^{14}\text{C}$ -Glycin-Einbau durch  $15\,000 \times g$  Überstände von Schweinenebennieren geschwindigkeitsbestimmenden Aktivität der löslichen Zellfraktion von Rattennebennieren dissoziierbar sind. Dreißig Stunden nach Hypophysektomie war die Corticosteroidinkretion längst auf Basiswerte abgefallen und zeigte ein übliches Ansprechen auf ACTH, während die Proteinsynthese durch den Stress der Hypophysektomie noch stimuliert und durch ACTH-Gaben nicht weiter zu steigern war. Acht Tage nach Hypophysektomie ist die Corticosteroidinkretion gegen ACTH fast refraktär, die Aktivität der löslichen Zellfraktion dagegen durch ACTH zu verdoppeln. Die gefundene Dissoziierbarkeit spricht gegen eine obligate Verknüpfung der stimulierenden ACTH-Wirkung auf Corticosteroidsynthese und Proteinsynthese.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. P. C. SCRIBA danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, - besonders herzlich aber für seine unermüdliche Hilfe.

Herrn Professor Dr. med. K. SCHWARZ sei für die anregenden Diskussionen gedankt.

# LITERATURVERZEICHNIS

- 1) SCRIBA, P.C., R. HACKER, P. DIETERLE, F. KLUGE, W. HOCHHEUSER und K. SCHWARZ: ACTH-Bestimmungen im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis  
Klin. Wochenschrift 44, 1343, 1966
- 2) HACKER, R.: Biologische Bestimmung der ACTH-Aktivität im menschlichen Plasma  
Dissertation, Universität München, 1966
- 3) SABA, N.: Mechanism of corticotrophin action in "The biosynthesis and secretion of adrenal cortical steroids",  
Biochem. Soc., Sympos. Herausg. CLARK, F. and J.K. GRANT, Cambridge 1960, S. 96
- 4) HECHTER, O. u. G. LESTER: Cell permeability and hormone action  
Rec. Progr. Horm. Res. 16, 139 (1960)
- 5) FORTIER, C.: Adenohypophysis and adrenal cortex  
Ann. Rev. Physiol. 24, 224 (1962)
- 6) SCRIBA, P.C.: Zum biochemischen Wirkungsmechanismus des adrenocorticotropen Hormons:  
Einfluß auf die Synthese von Eiweiß in der Nebenniere  
Klin. Wschr. 42, 463 (1964)
- 7) HLF, R.: Mechanism of action of ACTH  
New Engl. J. Med. . 273, 798 (1965)
- 8) LIPSCOMB, H. S. u. D.H. NELSON: Dynamic changes in ascorbic acid and corticosteroids in adrenal vein blood after ACTH  
Endocrinology 66, 144 (1960)
- 9) EVANS, H.M.: Present position of our knowledge of anterior pituitary function  
J. Amer. Med. Ass. 101, 425 (1933)
- 9a) ANSELMINO, K.J., F. HOFFMANN u. L. HEROLD: Über das corticotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens  
Klin. Wschr. 12, 209 (1934)

- 9b) COLLIP, J. B.,  
E. M. ANDERSON und  
D. L. THOMSON: The adrenotropic hormone of the anterior  
pituitary lobe  
Lancet, 347 (1933) II
- 10) HARRISON, R. G. und  
M. J. HOEY: The adrenal circulation  
Blackwell Scientific, Public. Oxford (1960)
- 11) URQUHART, J.: Adrenal blood flow and the adrenocortical  
response to corticotropin  
Amer. J. Physiol. 209, 1162 (1965)
- 12) PORTER, J. C. u.  
M. S. KLAIBER: Corticosterone secretion in rats as a function  
of ACTH input and adrenal blood flow  
Amer. J. Physiol. 209, 811 (1965)
- 13) STAEHELIN, M., P. BARTHE  
u. P. A. DESAULLES: On the mechanism of the adrenal gland  
response to adrenocorticotrophic hormone  
in hypophysectomized rats  
Acta Endocrin. 50, 55 (1965)
- 14) STARK, E.,  
B. VARGA, Z. ACS und  
M. PAPP: Adrenal blood flow response to adreno-  
corticotrophic hormone and other stimuli  
in the dog  
Pflügers Arch. ges. Physiol. 285, 296  
(1965)
- 15) BRANSOME, E. D. u.  
W. J. REDDY: Hormonal effects in vitro on amino acid  
incorporation into rat adrenal protein:  
ACTH and growth hormone  
Arch. Biochem. Biophys. 101, 21 (1963)
- 16) HALKERSTONE, I. D. K.,  
M. FEINSTEIN und  
O. HECHTER: Inhibition of protein synthesis in rat adrenal  
glands by adrenocorticotrophin and cyclic  
3',5' -adenosin monophosphate  
Endocrinology 74, 649 (1964)
- 17) HALKERSTONE, I. D. K.,  
M. FEINSTEIN und  
O. HECHTER: Further observations on the inhibition of  
adrenal protein synthesis by ACTH in vitro  
Endocrinology 76, (1965) 801
- 18) SCRIBA, P. C.: Klinische und experimentelle Untersuchungen  
über Dynamik und Wirkungsweise des Adreno-  
corticotropins  
Habilitationsschrift, Universität München 1966

- 19) FARESE, R. V. und W.J. REDDY: Effect of ACTH on adrenal protein synthesis  
Endocrinology 73, 294 (1963)
- 20) COHEN, G. N. und F. GROS: Protein Biosynthesis  
Ann. Rev. Biochem. 29, 525 (1960)
- 21) BERG, P.: Specificity in protein Synthesis  
Ann. Rev. Biochem. 30, 293 (1961)
- 22) ARNSTEIN, H. R. V.: Mechanism of Protein Biosynthesis  
Brit. Med. Bull. 21, 217 (1965)
- 23) HOAGLAND, M. B., E. B. KELLER und P. C. ZAMECNIK: Enzymatic carboxyl aktivation of amino acids.  
J. biol. Chem. 218, 345 (1956)
- 24) HOAGLAND, M. B., M. L. STEPHENSON, L. I. HECHT, J. F. SCOTT u. P. C. ZAMECNIK: A soluble RNA intermediate in protein synthesis.  
J. biol. Chem. 231, 241 (1958)
- 25) KELLER, E. B. und P. C. ZAMECNIK: The effect of GDP and GTP on the incorporation of labeled amino acids into proteins.  
J. biol. Chem. 221, 45 (1956)
- 26) GROS, F., W. GILBERT, H. H. HIATT, G. ATTARDI, P. F. SPAHR und J. D. WATSON: Molecular and biological characterization of messenger RNA.  
Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 26, 111 (1961)
- 27) OCHOA, S.: Chemical basis of heredity, the genetic code.  
Experientia 20, 57 (1964)
- 28) SCOTT, R. B. und R. A. MALT: Stable messenger RNA in nucleated erythrocytes.  
Nature 203, 497 (1965)
- 29) NIU, M. C., C. C. CORDOVA, L. C. NIU und C. L. RADBILL: RNA-induced biosynthesis of specific enzymes.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1964 (1962)

- 30) NATHANS, D. und  
F. LIPMANN:  
Amino acid transfer from aminoacyl-RNA  
to protein on ribosomes of *E. coli*.  
*Proc. Nat. Acad. Sci.* 47, 497 (1961)
- 31) BISHOP, J.O. und  
R. S. SCHWEET:  
Participation of two enzyme fractions in  
the transfer of amino acids from amino-  
acyl-RNA to reticulocyte ribosomes.  
*Biochim. Biophys. Acta* 54, 617 (1961)
- 32) FESSENDEN, J.M. und  
K. MOLDAVE:  
Studies on amino acyl transfer from soluble  
RNA to rat liver ribonucleoprotein-particles:  
Effect of soluble and microsomal extracts.  
*Biochemistry* 1, 485 (1962)
- 33) FESSENDEN, J.M.,  
J. CAIRN-CROSS und  
K. MOLDAVE:  
Studies on polynucleotide-stimulated amino  
acyl transfer from soluble RNA to rat liver  
ribosomes.  
*Proc. Nat. Acad. Sci.* 49, 82 (1963)
- 34) SLAPIKOFF, S.,  
J.M. FESSENDEN und  
K. MOLDAVE:  
Enzymatic incorporation of amino acid  
from amino acyl soluble ribonucleic acid  
into ribosomal nucleic acid and ribosomal  
protein.  
*J. biol. Chem.* 238, 3670 (1963)
- 35) GASIOR, E. und  
K. MOLDAVE:  
Resolution of aminoacyl-transferring  
enzymes from rat liver by molecular  
sieve chromatography.  
*J. biol. Chem.* 240, 3346 (1965)
- 36) TAKANAMI, M. und  
T. OKAMOTO:  
Isolation of an enzyme catalyzing the  
transfer of amino acids from soluble RNA  
to microsomal ribonucleoprotein.  
*Biochim. Biophys. Acta* 44, 379 (1960)
- 37) TAKANAMI, M.:  
Transfer of amino acids from soluble RNA  
to ribosome. I. Isolation of an enzyme  
catalysing the transfer reaction  
*Biochim. Biophys. Acta* 51, 85 (1961)
- 38) TAKANAMI, M.:  
Transfer of amino acids from soluble RNA  
to ribosome.  
*Biochim. Biophys. Acta* 61, 432 (1962)

- 39) SCRIBA, P.C. und W.J. REDDY: ACTH and adrenal protein synthesis. Feder. Proceed. 22, No. 30 (1963)
- 40) SCRIBA, P.C. und W.J. REDDY: Adrenocorticoatrophin and adrenal protein synthesis. Endocrinology 76, 745 (1965)
- 41) FARESE, R. V.: Quantitative comparison of the effects of ACTH administration on the activities of soluble cell fraction and microsomes for incorporation of amino acid into protein. Endocrinology 76, 795 (1965)
- 42) FARESE, R. V.: Early effects of ACTH on adrenal protein synthesis. Endocrinology 78, 125 (1966)
- 43) FARESE, R. V.: Changes in adrenal polysomes following ACTH administration. Endocrinology 77, 128 (1965)
- 44) LIAO, S. und H. G. WILLIAMS-ASHMAN: An effect of testosterone on amino acid incorporation by prostatic ribonucleoprotein particles. Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1956 (1962)
- 45) KOBLET, H. und G. RIVA: Beschleunigung der Aminosäureninkorporation in Zellkerneiweiße durch Androgene. Schweiz. med. Wschr. 93, 1811 (1963)
- 46) LIAO, S.: Influence of testosterone on template activity of prostatic ribonucleic acids. J. biol. Chem. 240, 1236 (1965)
- 47) LIAO, S., K.R. LEININGER, D. SAGHER und R. W. BARTON: Rapid effect of testosterone on ribonucleic acid polymerase activity of rat ventral prostate. Endocrinology 77, 763 (1965)
- 48) MUELLER, G.C.: Some biochemical studies on the mechanism of action of estrogens. Cancer 10, 716 (1957)

- 49) MUELLER, G.C.,  
J. GORSKI und  
Y. AIZAWA: The role of protein synthesis in early  
estrogen action.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 164 (1964)
- 50) HAMILTON, R.H.: Isotopic studies on estrogen-induced  
accelerations of RNA and protein synthesis.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 373 (1963)
- 51) WILSON, J.D.: Influence of estradiol administration on  
protein synthesis in homogenates of hen  
oviduct.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8,  
175 (1962)
- 52) SCHMIDT, H., H. WALTHER  
und K.D. VOIGT: The influence of estradiol on the nucleic  
acid, protein and enzyme activity content  
of the rat uterus.  
Acta Endocrinol. Suppl. 100, 126 (1965)
- 53) GOLDSTEIN, L.,  
E.J. STELLA und W.E. KNOX: The effect of hydrocortisone on tyrosine-  
ketoglutarate transaminase and tryptophan  
pyrrolase activities in the perfused rat  
liver.  
J. biol. Chem. 237, 1723 (1962)
- 54) HÜBENER, H.J.: Die physiologische Funktion der NNR-  
Hormone als Enzyminduktoren.  
Dt. med. Wschr. 87, 438 (1962)
- 55) HENNING, H.V.,  
I. SEIFFERT und  
W. SEUBERT: Cortisol-induzierter Anstieg der Pyruvat-  
carboxylaseaktivität in der Rattenleber.  
Biochim. Biophys. Acta 77, 345 (1963)
- 56) LANG, N. und C.E. SEKERIS: Zum Wirkungsmechanismus der Hormone III.  
Einfluß von Cortisol auf den Ribonucleinsäure-  
und Proteinstoffwechsel in Rattenleber.  
Zschr. Physiol. Chem. 339, 238 (1964)
- 57) SCHMID, W., P.P. DUKES,  
und C.E. SEKERIS: Einfluß von Steroid-Hormonen auf die  
RNS-Synthese in isolierten Zell-Kernen.  
Z. klin. Chem. 3, 211 (1965)

- 58) SEUBERT, W. und  
W. PRINZ:  
Zur Rolle des Acetyl-CoA als Regulator  
der Gluconeogenese.  
Z. klin. Chem. 3, 210 (1965)
- 59) SOKOLOFF, C.,  
P.L. CAMPBELL,  
C.M. FRANCIS und  
C.B. KLEE:  
Thyroxine stimulation of amino acid incor-  
poration into ribosomal protein.  
Biochim. Biophys. Acta 76, 329 (1963)
- 60) SOKOLOFF, C., S. KAUF-  
MANN, P.L. CAMPBELL,  
C.M. FRANCIS und  
H.V. GELBOIN:  
Thyroxine stimulation of amino acid incor-  
poration into protein.  
Localisation of the stimulated step.  
J. Biol. Chem. 238, 1432 (1963)
- 61) SOKOLOFF, C.,  
C.M. FRANCIS und  
P.L. CAMPBELL:  
Thyroxine stimulation of amino acid incor-  
poration into protein independent of any  
action on messenger RNA synthesis.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 52, 728 (1964)
- 62) SELLINGER, O.Z. und  
K.L. LEE:  
The induction of mitochondrial  $\alpha$ -glycero-  
phosphate-DH by thyroid hormone: Evidence  
for enzyme synthesis.  
Biochim. Biophys. Acta 91, 183 (1964)
- 63) LEE, Y.P. und  
H.A. LARDY:  
Influence of thyroid hormones on L- $\alpha$ -  
glycerophosphate dehydrogenases and  
other dehydrogenases in various organs  
of the rat.  
J. biol. Chem. 240, 1427 (1965)
- 64) TISHLER, P.V. und  
S.H. INGBAR:  
Correlative effects of puromycin on  
131-I metabolism and amino acid incor-  
poration by calf thyroid slices.  
Endocrinology 76, 295 (1965)
- 65) RUEGAMER, W.R.,  
G.H. NEWMAN,  
D.A. RICHERT und  
W.W. WESTERFIELD:  
Specificity of the  $\alpha$ -glycerophosphate  
dehydrogenase and malic enzyme response  
to thyroxine.  
Endocrinology 77, 707 (1965)
- 66) WESTERFIELD, W.W.,  
D.A. RICHERT und  
W.R. RUEGAMER:  
New assay procedure for thyroxine analogs.  
Endocrinology 77, 802 (1965)

- 67) KRAHL, M.E. : Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -amino acid precursors into adipose tissue protein. An insulin stimulation not involving glucose or amino acid transport.  
Biochim. Biophys. Acta 35, 556 (1959)
- 68) MANCHESTER, K.L. und I.G. WOOL: Insulin and incorporation of amino acids into protein of muscle.  
Biochem. J. 89, 202 (1963)
- 69) CARLIN, H. und O. HECHTER: Insulin action and protein synthesis in diaphragm muscle.  
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 115, 127 (1964)
- 70) WOOL, I.G. : Effect of insulin on accumulation of radio-activity from amino-acids by isolated in-tact rat diaphragm.  
Nature 202, 196 (1964)
- 71) FRITZ, G.R. und E.KNOBIL: Amino acid transport and protein synthesis in muscle. Action of insulin.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 873 (1964)
- 72) WEBER, G., N.B. STAMM und E. A. FISHER: Insulin; Inducer of pyruvate kinase.  
Science 149, 65 (1965)
- 73) KORNER, A. : Effect of hypophysectomy on the ability of rat liver microsomes in a cell-free system to incorporate radioactive amino-acids into their proteins.  
Nature 181, 422 (1958)
- 74) KOSTYO, J.L. : Separation of the effects of growth hormone on muscle amino acid transport and protein synthesis.  
Endocrinology 75, 113 (1964)
- 75) KORNER, A. : Regulation of the rate of synthesis of messenger ribonucleic acid by growth hormone.  
Biochem. J. 92, 449 (1964)

- 76) CREEK, R. O. :  
Effect of thyrotropin on the weight, protein, ribonucleic acid and the radioactive phosphorus uptake of chick thyroids. *Endocrinology* 76, 1124 (1965)
- 77) FARESE, R. V. und W.J. REDDY:  
Observations on irrelations between adrenal proteins, RNA and DNA during prolonged ACTH administration. *Biochim. Biophys. Acta* 76, 145 (1963)
- 78) FIALA, S., E.E. SPROUL und A. FIALA:  
The action of ACTH on nucleic acids and subcellular elements of the adrenal cortex. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 115 (1956)
- 79) BRUNS, J.D. und A.F. HALE:  
The distribution of ribonucleic acid and some other substances in adrenal cortex after administration of adrenocorticotrophin. *J. Physiol.* 146, 465 (1959)
- 80) BRANSOME, E.D. und W.J. REDDY:  
Studies of adrenal nucleic acids: The influence of ACTH, unilateral adrenalectomy and GH upon adrenal RNA and DNA in the dog. *Endocrinology* 69, 997 (1961)
- 81) BRANSOME, E.D. und W.J. REDDY:  
Incorporation of amino acids into rat adrenal nucleic acids: Effects of ACTH and GH. *Endocrinology* 73, 540 (1963)
- 82) BRANSOME, E.D. und W.J. REDDY:  
Studies of adrenal nucleic acids, RNA, DNA and total protein in human adrenal dysfunction. *Metabolism* 12, 27 (1963)
- 83) BRANSOME, E.D. und E. CHARGAFF:  
Synthesis of ribonucleic acids in the adrenal cortex: Early effects of adrenocorticotrophic hormone. *Biochim. Biophys. Acta* 91, 180 (1964)
- 84) BURY, H.P.R. und W.A.J. CRANE:  
Effect of age and hormonal state on the numbers of DNA synthesizing nuclei in rat adrenal cortex. *Nature* 205, 301 (1965)

- 85) SIGEL, M.B. und  
J.T. DOWLING:  
Specificity of corticotrophin induced  
increase in mitochondrial ribonucleic acid.  
Am. J. Physiol. 206, 1156 (1964)
- 86) GANIS, F.M.,  
L.L. MILLER und  
L.R. AXELROD:  
Effect of ACTH on protein synthesis in  
isolated perfused beef adrenal gland.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89,  
634 (1955)
- 87) SCRIBA, P.C. und  
W.J. REDDY:  
Zum biochemischen Mechanismus der  
Stimulation der Proteinsynthese der Neben-  
niere durch adrenocorticotropes Hormon. -  
11. Sympos. Dt. Ges. Endokrinol.  
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-  
Heidelberg, 206 (1964)
- 88) FARESE, R.V.:  
Changes in <sup>14</sup>C-glycine-incorporating acti-  
vities of rat adrenal microsomes and soluble  
cell fraction during prolonged adrenocortico-  
tropin administration.  
Biochim. Biophys. Acta 91, 515 (1964)
- 89) FARESE, R.V.:  
Further studies on the stimulation of  
adrenal protein synthesis by ACTH; An  
effect on microsomes and ribosomes.  
Endocrinology 74, 579 (1964)
- 90) SCRIBA, P.C. und  
M. FRIES:  
Aminoacyltransferase Stimulation of Protein-  
synthesis by Pig Adrenal Polysomes.  
Nature, 1967 (im Druck)
- 91) SCHNEIDER, W. und  
H.J. STAUDINGER:  
Zum Wirkungsmechanismus von Vitamin C.  
Klin. Wschr. 42, 879 (1964)
- 92) KORITZ, S.B. und  
F.G. PERON:  
Studies on the mode of action of adreno-  
corticotrophic hormone.  
J. biol. Chem. 230, 343 (1958)
- 93) SWEAT, M.L. und  
M.J. BRYSON:  
Steroid 11- $\beta$  oxygenation, ascorbic acid,  
epinephrine and adrenochrome interrelations  
in the adrenal gland.  
Endocrinology 76, 773 (1965)

- 94) HAYNES, R.C. jr. und L. BERTHET: Studies on the mechanism of action of ACTH.  
J. biol. Chem. 225, 115 (1957)
- 95) HAYNES, R.C. : The activation of adrenal phosphorylase by ACTH.  
J. biol. Chem. 233, 1220 (1958)
- 96) ROBERTS, S. , J.E. CREANCE und D.D. FOWLER: Stimulation of steroid C-11- $\beta$ -hydroxylase activity in adrenal homogenates by cyclic 3',5'-adenosin monophosphate.  
Nature 203, 759 (1964)
- 97) GRANT, J.K. und T. SYMINGTON: Effect of ACTH therapy on the in vitro 11- $\beta$  hydroxylation of the desoxycorticosterone by human adrenal homogenates.  
J. clin. Endocrin. 17, 933 (1957)
- 98) FERGUSON, J.J. jr. : ACTH-responsiveness, protein synthesis and puromycin.  
Feder. Proceed. 22, No. 2211 (1963)
- 99) FERGUSON, J.J. jr. : Puromycin and adrenal responsiveness to ACTH.  
Biochim. Biophys. Acta 57, 616 (1962)
- 100) FERGUSON, J.J. jr. : Protein synthesis and adrenocorticotropin responsiveness.  
J. biol. Chem. 238, 2754 (1963)
- 101) FERGUSON, J.J. jr. und Y. MORITA: RNA-synthesis and adrenocorticotropin responsiveness. Biochim. Biophys. Acta 87, 348 (1964)
- 102) PFEIFFER, E.F. , W.E. VAUBEL, K. RETIENE, D. BERG und H. DITSCHUNEIT: ACTH-Bestimmung mittels Messung des Plasma-Corticosterons der mit Dexamethason hypophysenblockierten Ratte.  
Klin. Wschr. 38, 980 (1960)
- 103) HARDING, B.W. und D.H. NELSON: Effect of hypophysectomy on NADP and NADPH concentration and corticosteroid secretion in rat adrenal.  
Endocrinology 75, 501 (1964)

- 104) HARDING, B.W. und  
D.H. NELSON:  
Effect of hypophysectomy on several rat  
adrenal NADPH-generating and oxidizing  
systems.  
Endocrinology 75, 506 (1964)
- 105) LIDDLE, G.W.,  
D. ISLAND und C.K.  
MEADOR:  
Normal and abnormal regulation of corti-  
cotropin secretion in man.  
Rec. Progr. Horm. Res. 18, 125 (1962)
- 106) OHSAWA, N.:  
Effect of administration of ACTH on  
adrenal responsiveness of hypophysectomized  
rats.  
Endocrinology 77, 461 (1965)
- 107) SCRIBA, P.C. und  
F. KLUGE:  
Dissociation of Stimulatory Effects of  
ACTH on Adrenal corticosterone and  
Protein Synthesis Following Hypophysectomy.  
Nature, 1967 (im Druck)
- 108) BEHRENS, M.:  
Über die Lokalisation der Hefenucleinsäuren  
in pflanzlichen Zellen.  
Z. Physiol. Chemie 253, 185 (1938)
- 109) BEHRENS, M.:  
Zell- und Gewebetrennung, Handbuch  
der biologischen Arbeitsmethoden (edited  
by Abderhalden, E.) Vol. V Part. 10, II,  
1363  
Urban und Schwarzenberg, Berlin (1938)
- 110) MARTIN, R.G. und  
B.N. AMES:  
A method for determining the sedimentation  
behavior of enzymes.  
Application to protein mixtures.  
J. biol. Chem. 236, 1372 (1961)
- 111) A TECHNICAL REVIEW:  
An Introduction to Density Gradient  
Centrifugation.  
Beckman Instruments, Inc., Palo Alto,  
California
- 111a) LEUTHARDT, F.:  
Lehrbuch der physiologischen Chemie  
Walter de Gruyter & Co.,  
Berlin 1963, S. 99

- 112) BRITTEN, R.J.  
und R.B. ROBERTS:  
High resolution density gradient sedimentation analysis.  
*Science* 131, 32 (1960)
- 113) LOWRY, O.R.,  
N.J. ROSEBROUGH,  
A.L. FARR und  
R.V. RANDALL:  
Protein measurement with the FOLIN phenol reagent.  
*J. biol. Chem.* 193, 265 (1951)
- 114) POTTER, V.R. und  
C.A. ELVEJHEM:  
A modified method for the study of tissue oxydations.  
*J. biol. Chem.* 114, 495 (1936)
- 115) PALADE, G.E.  
und P. SIEKEVITZ:  
Livermicrosomes, an integrated morphological and biochemical study.  
*J. Biophys. Biochemical. Cytol.* 2,  
171 (1956) "
- 116) SCHNEIDER, W.C.  
und G.H. HOGEBOM:  
Cytochemical studies of mammalian tissues: The isolation of cell components by differential centrifugation: A review.  
*Cancer Res.* 11, 1 (1951)
- 117) HOPPE-SEYLER, THIERFELDER:  
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Allgemeine Untersuchungsmethoden, Erster Teil,  
S. 122 - 260  
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953
- 117a) PETERSON, E.A. und  
H.A. SOBER:  
Column chromatography of proteins: Substituted celluloses. in "Methods in enzymology" Band V (1962)  
Herausg. S. COLOWICK und N.O. KAPLAN
- 118) PETTE, D.:  
Mitochondrial enzyme activities. in "Regulation of metabolic processes in mitochondria". Herausg. J.M. TAGER, S. PAPA, E. QUAGLIARIELLO and E.C. SLATER  
Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1966

- 119) SCHNEIDER, W.C. Phosphorus compounds in animal tissues.  
I. Extraction and estimation of desoxy-  
pentose nucleic acid and of pentose  
nucleic acid.  
J. biol. Chem. 161, 293 (1945)
- 119a) DISCHE, Z.: Color reactions of nucleic acid components.  
in "The nucleic acids", Hrsg. E. Chargaff  
u. J.N. Davidson, Acad. Press, N.Y.  
(1955) 301
- 120) SCHNEIDER, W.C. Intracellular distribution of enzymes.  
und G.H. HOGEBOM: J. biol. Chem. 183, 123 (1950)
- 121) LITTLEFIELD, J.W. und Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -amino acids into  
E.B. KELLER: ribonucleoprotein particles from the  
EHRlich mouse ascites tumor.  
J. biol. Chem. 224, 13( 1957)
- 122) KORNER, A. : Incorporation in vitro of  $^{14}\text{C}$ -amino acids  
into protein of rat liver microsomal  
particles (PN).  
Biochim. Biophys. Acta 35, 554 (1959)
- 123) KURLAND, C.G. : Molecular characterization of RNA from  
E. coli ribosomes.  
J. molec. Biol. 2, 83 (1960)
- 124) CAMPBELL, P. N. , Studies on the role of the morphological  
C. COOPER und constituents of the microsome fraction from  
M. HICKS: rat liver in protein synthesis.  
Biochem. J. 92, 225 (1964)
- 125) SPYRIDES, G.J. und Polypeptide synthesis with sucrose gradient  
F. LIPMANN: fractions of E. coli ribosomes.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1977 (1962)
- 126) RISEBROUGH, R.W. , Messenger-RNA attachment to active  
A. TISSIERES und ribosomes.  
J.D. WATSON: Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 430 (1962)
- 127) JACKSON, R.J. , Assay of polysomes and ribosomes in  
A.J. MUNRO und particle preparations.  
A. KORNER: Biochem. J. 89, 11 P (1963)

- 128) WETTSTEIN, F.O. ,  
T. STAEHELIN und  
H. NOLL: Ribosomal aggregate engaged in protein  
synthesis. Characterization of the  
ergosome.  
Nature 197, 430 (1963)
- 129) KLUGE, F. : Dissertation, Universität München, 1967,  
in Vorbereitung
- 130) PFEIFFER, E.F. ,  
F. GARMENDIA, Exogene und endogene ACTH-Aktivitäten  
im nativen Plasma des Menschen.  
E. VAUBEL und K. RETIENE: Erg. Inn. Med. , N.F. 20, 127 (1963)



## LEBENS LAUF

Am 27. Oktober 1941 wurde ich als Tochter des Rechtsanwalts und berufsmäßigen Stadtrats a. D. Dr. oec. publ. Konrad Fries und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Plawneek, in Nürnberg geboren. Von 1947 - 1952 besuchte ich die Rudolf-Steiner-Schule in Nürnberg. Ab Herbst 1952 war ich Schülerin der Städtischen Mädchenoberrealschule Nürnberg I, Zweig Realgymnasium, wo ich 1961 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1961/62 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Erlangen-Nürnberg. Dort bestand ich im Februar 1963 das Vorphysikum und im Juli 1964 das Physikum. Seit dem Wintersemester 1964/65 setzte ich mein Studium an der Universität München fort und bestand dort im Dezember 1967 das ärztliche Staatsexamen.





